

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA

ESCUELA DE POSTGRADO

**MAESTRIA EN MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA**



**CARACTERIZACION FENOTÍPICA Y
MOLECULAR DEL AGENTE CAUSAL DE
SALMONELOSIS EN CUYES (*Cavia porcellus*)
DE AREQUIPA**

**Presentado por:
JORGE ERNESTO MANRIQUE MEZA**

**Para optar el Grado Académico de:
MAGISTER EN MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA**

AREQUIPA – PERU

2009

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi sincero agradecimiento:

A quienes durante mis estudios les he restringido la dedicación, tiempo y afecto; sin embargo, recibí a cambio amor, comprensión, aliento y apoyo incondicional, sólo esperando que me sienta bien y que culmine exitosamente la meta trazada.

Me refiero a mi familia :

Juanita: Mi amadísima esposa. Jorge, Carlos y Luís Miguel: Nuestros hijos

Giancarlo, Miguel Ángel y Sebastián: Nuestros nietos

Elizabeth, Olenka y Celia: Nuestras hijas políticas

Miguel Angel y Wilbert: Nuestros hijos que están en nuestro recuerdo por siempre.

A la Universidad Católica de Santa María

A los Directivos de la Escuela de Post Grado

A los docentes de la Escuela de Post Grado de Medicina Veterinaria y Zootecnia, porque tuvieron la difícil tarea de modelar nuestro liderazgo espiritual, académico y de investigación científica.

A mis compañeros de estudio por compartir expectativas, frustraciones, triunfos y porque siempre estuvieron presentes para darme la mano amiga y el apoyo oportuno

A mis compañeros de LABVETSUR por su apoyo y soportaron las sobrecargas de trabajo.

A todos mis amigos ¡SINCERAMENTE GRACIAS!

EPIGRAFES

“No hay nada nuevo bajo el sol,
pero cuantas cosas viejas hay que no conocemos”.

Ambrose Gwinet Bierce

"Ningún descubrimiento se haría ya si nos contentásemos con lo
que sabemos."

Lucio Anneo Séneca (4 a. C.-65 d. C.)

Las ciencias tienen las raíces amargas,
pero muy dulces los frutos.

Aristóteles

La mayoría de las ideas fundamentales de la ciencia son
esencialmente sencillas y, por regla general pueden ser
expresadas en un lenguaje comprensible para todos.

Albert Einstein

La ciencia se compone de errores, que a su vez,
son los pasos hacia la verdad.

Julio Verne

RELACION DE ABREVIATURAS

INDECOPI: Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual

***Salmonella Typhimurium* DT104:** *Salmonella* Typhimurium tipo definitivo 104

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa).

ADN: Acido desoxirribonucleico

ARN: Acido ribonucleico

WHO/OMS: World Health Organization/Organización Mundial de la Salud.

LPS: lipopolysaccharide (Lipopolisacárido)

ATP: Adenosin-tri-fosfato

INIA: Instituto Nacional de Investigación Agraria

TSI: Triple sugar iron (Agar hierro tres azúcares).

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute.

NCCLS: National Committee of Clinical and Laboratory Standard.

ELISA: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas).

ETA: Enfermedad transmitida por alimentos

µl: Microlitros

µg: Microgramos

RESUMEN

La bacteria *Salmonella* spp. es un importante agente etiológico de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) al hombre por contaminación de huevos, carne, leche y derivados cárnicos y lácticos. Así mismo, causa altas tasas de morbilidad y mortalidad en la crianza de la especie *Cavia porcellus* (cuyes). Su detección en alimentos y en centros de crianza de cuyes, previene brotes y permite implementar controles de vigilancia epidemiológica de la enfermedad. Los métodos fenotípicos de identificación son laboriosos, requieren tiempo y no todas las cepas aisladas pueden ser identificadas a nivel de serovariedades; contrariamente, la técnica de Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR) es una metodología rápida, específica y muy sensible para detectar, identificar y caracterizar a las especies del género *Salmonella*. El propósito del presente estudio fue caracterizar al agente etiológico de la Salmonelosis en cuyes en la Región de Arequipa, mediante técnicas de genotipificación. Se compararon 5 genotipos de aislamientos de casos clínicos de Salmonelosis en cuyes, identificados fenotípicamente como *Salmonella* spp. Los resultados de genotipificación indican que la salmonelosis de cuyes, es producida por *Salmonella enterica subespecie enterica serovar Typhimurium* LT2 (*Salmonella* Typhimurium) y *Salmonella enterica subespecie enterica serovar enteritidis* (*Salmonella* Enteritidis).

Keywords: Genotipificación; *Salmonella*; *Cavia porcellus*; PCR.

SUMMARY

The *Salmonella spp.* is an important etiologic agent of foodborne diseases (ETAs) transmitted to men by poisoning of the meat and causes high mortality ranges to guinea-pigs (*Cavia porcellus*). Its detection in farms breeding guinea-pigs and in foodstuff could prevent the occurrence of foodborne disease and could allow the implementation of controls previous to the onset of the disease. The phenotypic methods of bacteriologic diagnose are very time consuming, they require time and not every isolate can be identified to a serotype level, on the contrary the PCR technique is a rapid methodology, specific and very sensitive for the detection, identification and characterization of the bacteria of the *Salmonella* genus. The purpose of this investigation was to characterize the etiologic agent of Salmonellosis in guinea-pigs by genotyping techniques. Five genotypes of isolates of clinic cases of Salmonellosis in guinea-pigs previously identified by phenotyping as *Salmonella spp.* The results of the genotyping indicated that the Salmonellosis in guinea-pigs is caused by *Salmonella enterica subespecie enterica serovar Typhimurium* LT2 (*Salmonella Typhimurium*) and *Salmonella enterica subespecie enterica serovar enteritidis* (*Salmonella enteritidis*).

Keywords: Genotipificación, *Salmonella*, *Cavia porcellus*, PCR.

INDICE GENERAL

| | |
|---|-----|
| Agradecimientos..... | i |
| Epigrafes | ii |
| Relacion de abreviaturas..... | iii |
| Resumen | iv |
| Summary | v |
| I. INTRODUCCION..... | 1 |
| II. RESULTADOS..... | 4 |
| 2.1. Caracterización fenotípica..... | 4 |
| 2.1.1. Aislamiento e identificación de <i>Salmonella spp.</i> | 4 |
| 2.1.2. Pruebas serológicas para la identificación de <i>Salmonella spp.</i> | 6 |
| 2.1.3. Determinación de resistencia antimicrobiana: Antibiosensibilidad..... | 7 |
| 2.2. Caracterización fenotípica..... | 10 |
| 2.2.1. Resultado del análisis bioinformático..... | 11 |
| III. DISCUSIÓN..... | 22 |
| 3.1. Perfil bioquímico y serotipificación..... | 22 |
| 3.2. Resistencia antibacteriana..... | 23 |
| 3.2.1. Resistencia a betalactámicos..... | 24 |
| 3.2.2. Resistencia a fluoroquinolonas..... | 25 |
| 3.2.3. Resistencia a Aminoglucósidos..... | 25 |
| 3.2.4. Resistencia a Tetraciclinas..... | 25 |
| 3.2.5. Resistencia a Sulfamidados y a combinaciones..... | 26 |
| 3.3. Genotificación..... | 29 |
| IV.CONCLUSIONES..... | 32 |
| V.RECOMENDACIONES..... | 33 |
| VI.BIBLIOGRAFIA..... | 34 |
| VII. ANEXOS..... | 38 |

INDICE DE TABLAS, GRAFICOS Y FIGURAS

| | Nombre | Página |
|-----------|---|---------------|
| Tabla 1 | Serotipificación de cepas de <i>S. Typhimurium</i> aisladas de cuyes, aplicando el "Esquema de Kauffmann White" | 6 |
| Tabla 2 | Resultados de la evaluación de la sensibilidad de <i>Salmonella Typhimurium</i> a diferentes antibióticos – Arequipa, 2008. | 7 |
| Tabla 3 | Titulación de anticuerpos de muestras de suero de cuyes para determinar Seroprevalencia de Salmonelosis en cuyes de la Región Arequipa | 9 |
| Tabla 4 | Resumen de los resultados de genotipificación de muestras de ADN de cuyes provenientes de la Región Arequipa. 2008 | 21 |
| | Nombre | Página |
| Gráfico 1 | Perfil de sensibilidad antimicrobiana de cepas de <i>Salmonella Typhimurium</i> aisladas de casos clínicos en el período 2005-2008 | 8 |
| Figura 1. | Flujograma del aislamiento e identificación bioquímica de <i>Salmonella spp.</i> , a partir de muestras de bilis, hígado, pulmones, ganglios, bazo, pulmones, riñones y útero en el período 2005-2008 | 5 |

I. INTRODUCCIÓN

Los cuyes (*Cavia porcellus*) sudamericanos, llamados “criollos” por los criadores andinos, probablemente provienen de un clon del sur del Perú y Chile, representando un linaje precolombino (1) y posteriormente se han diseminado al mundo con los nombres de “Guinea pig”, “conejillo de indias”. Hoy es fuente de proteínas para las poblaciones andinas de Perú, Bolivia y Ecuador, constituyendo una alternativa de ingreso económico para familias de menores recursos de la Región Arequipa. Sin embargo, la crianza de cuyes debe lograr los niveles de competitividad que demanda el mercado, a través de de investigaciones científicas orientadas a generar conocimientos sobre las características fenotípicas y genotípicas del agente etiológico de salmonelosis en cuyes; de tal manera, que se oferte al mercado un alimento inocuo

Como alimento cárnico para consumo de la población humana, debe alcanzar estándares de inocuidad definidos en la Norma Técnica Peruana 201.058:2006 de INDECOPI (2) referida a carne y productos cárnicos de *Cavia porcellus* (cuy); por lo que, existe la necesidad de incorporar en el proceso de crianza, los conceptos de buenas prácticas de crianza e inocuidad alimentaria. De otro lado, en otros países los cuyes tienen alta demanda como mascotas, constituyendo un riesgo de transmisión de salmonelosis al hombre (3, 4, 5).

El problema que motiva el presente estudio se ha definido como “en la literatura revisada hay escasa información científica sobre la caracterización fenotípica del agente causal de la salmonelosis en cuyes y no se ha encontrado información sobre su caracterización genotípica”. Aunque en el Perú, se ha identificado fenotípicamente a la *Salmonella enterica subespecie enterica*

serovar Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium), como el agente causal de la salmonelosis en cuyes, mediante la caracterización del comportamiento de la bacteria en cultivos microbiológicos, la tipificación bioquímica, serología y las pruebas de antibiosensibilidad (6, 7, 8).

La metodología utilizada para la identificación fenotípica de las cepas del género *Salmonella*, consiste en cultivos de agar Mc Conkey y agar Sangre, *tinción de Gram*, pruebas bioquímicas en agar Urea y agar *TSI (triple sugar iron)*. Complementan la identificación fenotípica, la antibiorresistencia, serotipificación y ELISA ("*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*").

La identificación genotípica comprende las pruebas de extracción de ácidos nucleicos, electroforesis de ADN, diseño de primers, reacción de amplificación (PCR), electroforesis y purificación del producto PCR, secuenciación del producto PCR y análisis bioinformático de las secuencias de ADN.

Los resultados del presente estudio permiten definir, si la enfermedad es producida sólo por *Salmonella* Typhimurium o intervienen otros serovares de la subespecie entérica. Posteriormente, permitirán determinar la sintomatología por cada agente etiológico e iniciar estudios para la elaboración de vacunas. Los criadores de cuyes, se beneficiarán al disponer de información para el control epidemiológico de la salmonelosis en cuyes y evitar las pérdidas económicas que causa esta enfermedad.

El informe de investigación se ha organizado en tres grandes divisiones, a saber, aspectos iniciales y formales (cubierta, dedicatoria, epígrafe, índice general, resumen e introducción), aspectos centrales (resultados, discusión, conclusiones y sugerencias), y aspectos finales (bibliografía y anexos). Una

limitación significativa para el estudio ha sido la falta de un laboratorio local que efectúe los análisis de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), impidiendo acceder directamente al proceso analítico y por supuesto el alto costo de análisis.

Un reconocimiento especial a la Dra. Claudia Choque por sus valiosos aportes en el área de microbiología, al Dr. Julio César Bernabé por su apoyo en la genotipificación y a LABVETSUR por el financiamiento parcial del estudio.



II. RESULTADOS

2.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

2.1.1. Aislamiento e identificación de *Salmonella spp.*

2.1.1.1. Aislamientos de *Salmonella spp.*

En LABVETSUR se recepcionan los casos clínicos de cuyes con sospecha de salmonelosis para ser sometidos a diagnóstico de laboratorio. Se tomaron muestras de hígado, útero, bazo, pulmones, ganglios mesentéricos y vesícula biliar, para la siembra directa en los medios de cultivo agar Sangre y agar Mc Conkey. Después se incubaron por 18 a 24 horas a 37°C.

2.1.1.2. Identificación de *Salmonella spp.*: Consta de los siguientes pasos:

- Observación visual de colonias:

En el cultivo de agar Sangre, se seleccionaron las colonias no hemolíticas, con un diámetro entre 2 y 3 milímetros, un color blanco-gris y textura viscosa. A la colonia seleccionada, se hizo una coloración de Gram. En el cultivo en agar Mac Conkey, se seleccionaron las colonias que tienen una coloración amarillenta (no fermentadoras de lactosa) y un diámetro de 2 a 3 milímetros.

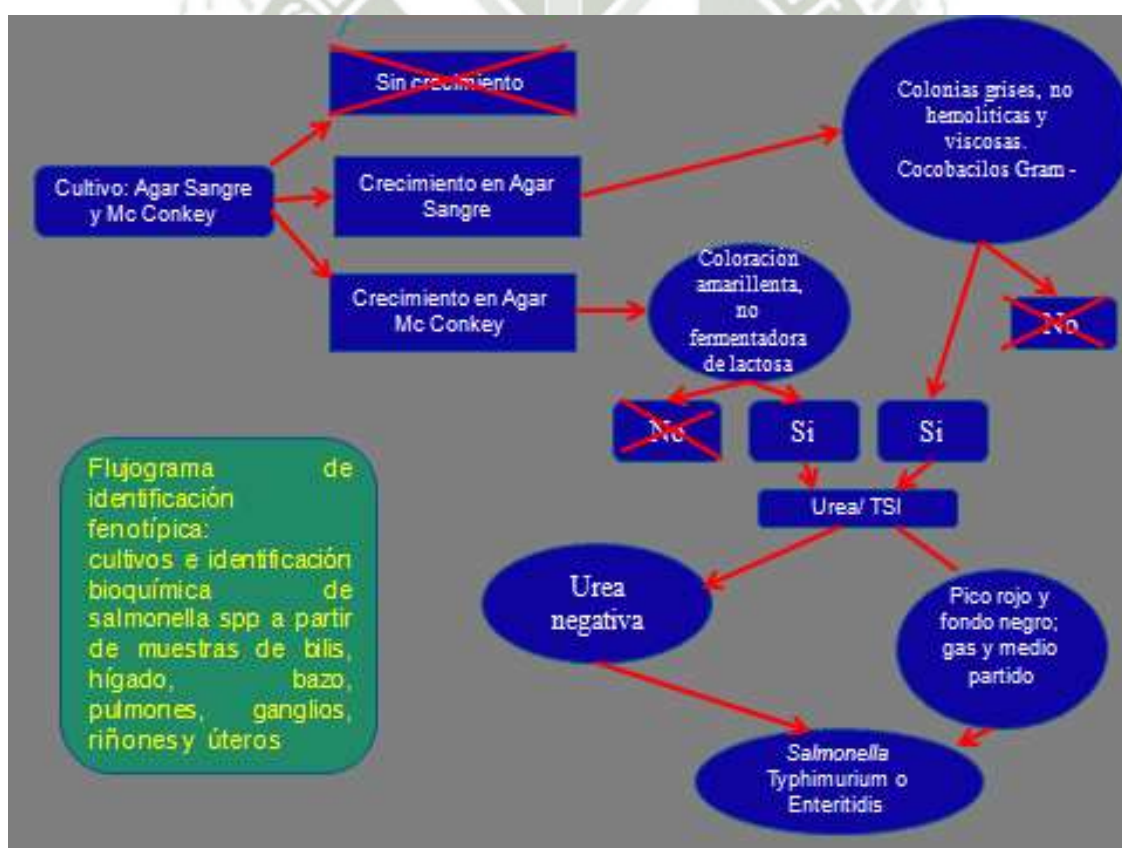
- Identificación bioquímica:

Las colonias sospechosas del cultivo en agar Mac Conkey fueron inoculadas en agar TSI y agar urea, mediante punción y estría. Se incubó por 18 a 24 horas a 37°C. Se consideró *Salmonella Typhimurium*, cuando la lectura del TSI fue pico alcalino (color rosado), fondo ácido (color amarillo), presencia de ácido sulfhídrico (color negro) y presencia de gas (medio partido o presencia de

burbujas). La bacteria *Proteus spp.*, presenta características similares, pero es urea positiva. En cambio *Salmonella Typhimurium*, es urea negativa (mantiene el color amarillo original).

Según los resultados, es recomendable hacer el aislamiento, cultivo e identificación con los métodos de agar Sangre, agar Mac Conkey y la batería de pruebas bioquímicas, de acuerdo al siguiente flujograma elaborado en base a Hoofar (9).

Figura 1. Flujograma de identificación fenotípica: cultivo e identificación bioquímica de salmonella spp. a partir de muestras de bilis, hígado, pulmones, ganglios, bazo, pulmones, riñones y útero de *Cavia porcellus*.



2.1.2. Pruebas serológicas para la identificación de *Salmonella* spp.

Las colonias que desarrollan en el pico del TSI, se diluyeron en suero fisiológico y se somete a una batería de antisueros contra el antígeno O presente en el lipopolisacarido de las bacterias Gram negativas, es posible identificar a la *Salmonella* aislada hasta el nivel de serotipo (poli O, A, B, C, D, etc.). Los resultados de la serotipificación (tabla 1), utilizando el esquema Kauffman-White (10), permiten identificar a las cepas como *Salmonella* Typhimurium; por cuanto, se ha determinado que la estructura somática es: O: 1, 4, 5,12 y la estructura flagelar es i:H. Sin embargo, no se ha identificado a la

Tabla 1. Serotipificación de cepas de *Salmonella entérica subespecie entérica* serovar *Typhimurium* aisladas de cuyes, aplicando el "Esquema de Kauffmann- White"

| Cepa | Antisueros | | | | Identificación |
|-------|------------|-----|-----|-----|----------------|
| | O-2 | O-4 | O-5 | i-H | |
| V51/4 | (+) | (+) | (+) | (+) | S. Typhimurium |
| V52/4 | (-) | (+) | (-) | (+) | S. Typhimurium |
| V49/8 | (-) | (+) | (-) | (+) | S. Typhimurium |
| V62/3 | (-) | (+) | (-) | (+) | S. Typhimurium |
| V69/4 | (-) | (+) | (-) | (+) | S. Typhimurium |
| V46/2 | (-) | (+) | (-) | (+) | S. Typhimurium |
| V42/8 | (-) | (+) | (-) | (+) | S. Typhimurium |
| V7/2 | (-) | (+) | (-) | (+) | S. Typhimurium |
| V8/2 | (-) | (+) | (-) | (+) | S. Typhimurium |
| V49/1 | (-) | (+) | (-) | (+) | S. Typhimurium |

Salmonella Enteritidis, debido a la baja capacidad de discriminación de la serotipificación.

2.1.3. Determinación de resistencia antimicrobiana: Antibiosensibilidad

Se evaluó 15 antimicrobianos mediante el método de difusión en agar o método de Kirby-Bauer que se encuentra estandarizado para *Enterobacteriaceas*

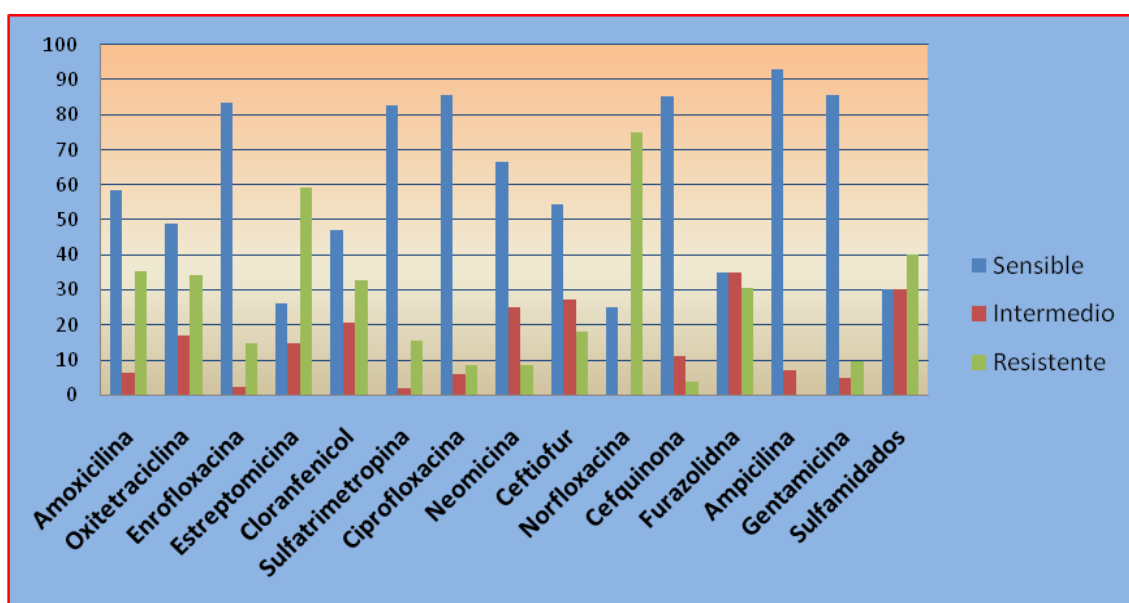
Tabla 2.- Resultados de la evaluación de la sensibilidad de *Salmonella Typhimurium* con diferentes antibióticos – Arequipa, 2008.

| Antimicrobianos | Sensibles (%) | Intermedios (%) | Resistentes (%) |
|-------------------|---------------|-----------------|-----------------|
| Ampicilina | 92.9 (13/14) | 7.1 (1/14) | 0.0 (0/14) |
| Ciprofloxacina | 85.7 (30/35) | 5.7 (2/35) | 8.6 (2/35) |
| Gentamicina | 85.7 (36/42) | 4.8 (2/42) | 9.5 (4/42) |
| Cefquinona | 85.2 (23/27) | 11.1 (3/27) | 3.7 (1/27) |
| Enrofloxacin | 83.3 (40/48) | 2.1 (1/48) | 14.6 (7/48) |
| Sulfatrimetropina | 82.7 (43/52) | 1.9 (1/52) | 15.4 (8/52) |
| Neomicina | 66.7 (8/12) | 25.0 (3/12) | 8.3 (1/12) |
| Amoxicilina | 58.33 (28/48) | 6.25 (3/48) | 35.42 (17/48) |
| Ceftiofur | 54.6 (6/11) | 27.3 (3/11) | 18.2 (2/11) |
| Oxitetraciclina | 48.8 (20/41) | 17.1 (7/41) | 34.2 (14/41) |
| Cloranfenicol | 46.9 (23/49) | 20.4 (10/49) | 32.7 (16/49) |
| Furazolidona | 34.8 (8/23) | 34.8 (8/23) | 30.4 (7/23) |
| Sulfamidados | 30.0 (3/10) | 30.0 (3/10) | 40.0 (4/10) |
| Estreptomycin | 25.9 (7/27) | 14.8 (4/27) | 59.3 (16/27) |
| Norfloxacin | 25.0 (5/20) | 0.0 (0/20) | 75.0 (15/20) |

La interpretación de la tabla 2, indica que sólo la Ampicilina es sensible en un 100% y sería el antibiótico de primera elección para el tratamiento. Los antibióticos de segunda elección se consideran a Ciprofloxacina, Gentamicina, Cefquinona, Enrofloxacin, Sulfatrimetropina, Neomicina, Amoxicilina y Ceftiofur. En el caso de antibióticos con porcentajes de resistencia por encima

del 26% (Amoxicilina, Oxitetraciclina, Cloranfenicol, Furazolidona, sulfamidados, Estreptomicina y Norfloxacin), no se recomendaría su uso en los tratamientos, salvo el caso que se realice un antibiograma específico para la cepa aislada.

Gráfico 1.- Perfil de sensibilidad antimicrobiana de cepas de *Salmonella* Typhimurium aisladas de casos clínicos en el período 2005-2006



De un total de 415 cultivos de muestras de casos clínicos de cuyes e identificados fenotípicamente como *Salmonella* Typhimurium en el periodo de estudio (2005- 2006). El 47.47% (197/415) son cepas de *Salmonella* Typhimurium cuya resistencia a Ampicilina, Ciprofloxacina, Gentamicina, Cefquinona, Enrofloxacin, Sulfametoxazole + Trimetropina, Neomicina y Cefotiofur, está por debajo del 25%. El 41.20% de las cepas de *Salmonella* Typhimurium tienen un rango de resistencia entre el 26 y 50% y corresponde a los antimicrobianos: Amoxicilina, Oxitetraciclina, Cloranfenicol, Furazolidona y Sulfamidados. El 11.33% de las cepas de *Salmonella* Typhimurium tienen un porcentaje de resistencia sobre el 51% y corresponde a los antimicrobianos:

Estreptomicina y Norfloxacin. Llama la atención el alto porcentaje de resistencia a la Norfloxacin.

2.1.4. SEROPREVALENCIA

Pruebas de ELISA: Se han analizado 20 muestras de suero de cuyes clínicamente sanos con el kit de ELISA FLOCKSCREEN™ (*Salmonella* Typhimurium antibody ELISA Kit), los resultados, se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Titulación de anticuerpos de muestras de suero de cuyes para determinar seroprevalencia de salmonelosis en cuyes de la Región Arequipa

| Muestra | Absorbancia | Título (s/p) | Interpretación |
|---------|-------------|--------------|----------------|
| 33 | 0.058 | 0 | NEGATIVO |
| 32 | 0.064 | 2.4 | NEGATIVO |
| 38 | 0.062 | 0 | NEGATIVO |
| 58 | 0.053 | 0 | NEGATIVO |
| 417 | 0.057 | 0 | NEGATIVO |
| 423 | 0.069 | 4.2 | NEGATIVO |
| 406 | 0.065 | 2.9 | NEGATIVO |
| 408 | 0.057 | 0 | NEGATIVO |
| 410 | 0.057 | 0 | NEGATIVO |
| 416 | 0.055 | 0 | NEGATIVO |
| 28 | 0.065 | 2.9 | NEGATIVO |
| 40 | 0.060 | 0 | NEGATIVO |
| 39 | 0.054 | 0 | NEGATIVO |
| 416 | 0.060 | 0 | NEGATIVO |
| 424 | 0.093 | 142.93 | NEGATIVO |
| s/n | 0.060 | 0 | NEGATIVO |
| 48 | 0.058 | 0 | NEGATIVO |
| 53 | 0.058 | 0 | NEGATIVO |

| | | | |
|-----|-------|---|----------|
| 58 | 0.058 | 0 | NEGATIVO |
| 114 | 0.058 | 0 | NEGATIVO |

De acuerdo al protocolo, la interpretación se hace en función de los valores de absorbancia, de 0-459 son considerados negativos; de 460–784 sospechosos; y mayor a 785 positivos. Según los resultados de la tabla 3, aparentemente las granjas de donde proceden los cuyes, son libres de salmonelosis. Pero es posible que los anticuerpos no sean específicos para el antígeno porque el kit de ELISA es para aves y en el mercado no está disponible un kit de ELISA para salmonelosis en cuyes.

2.2. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA

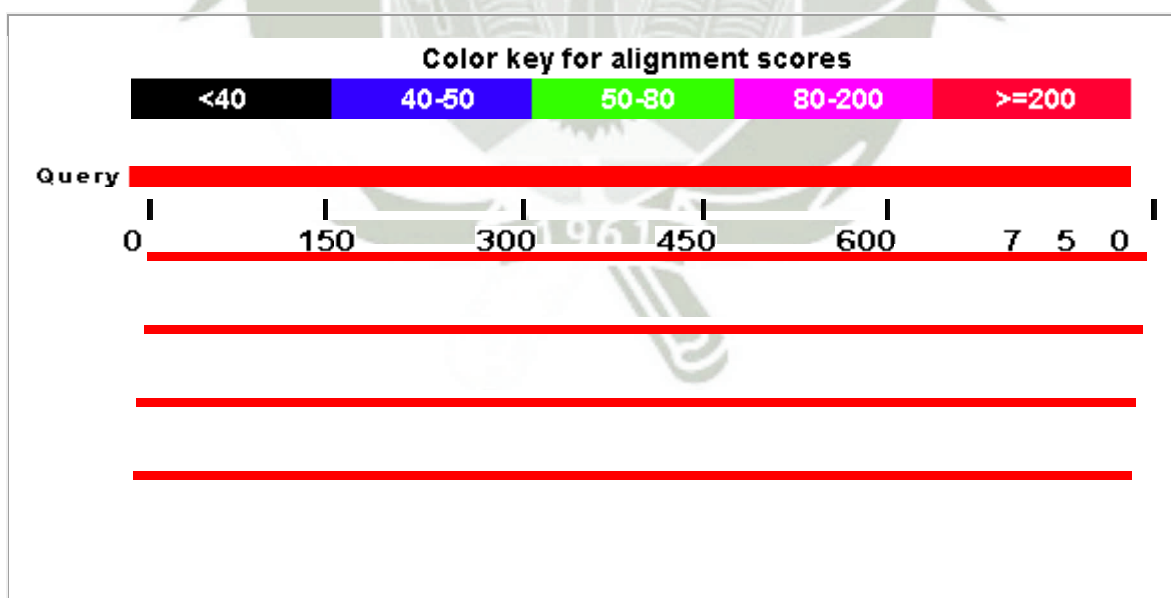
Se han procesado 5 muestras de cultivos de cepas identificadas fenotípicamente como *Salmonella* Typhimurium y provenientes de cuyes clínicamente sospechosos de salmonelosis. Las muestras fueron sometidas al proceso de la extracción de ácidos nucleicos, electroforesis de ADN, diseño de primers, reacción de amplificación PCR, electroforesis de productos de PCR, extracción y purificación de productos de PCR, secuenciación de productos de PCR y el análisis bioinformático. El análisis bioinformático permite extraer información útil de datos producidos por la secuenciación de las muestras de ADN de las cepas identificadas como *Salmonella* Typhimurium.

2.2.1. RESULTADO DEL ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.

2.2.1.1. Secuencia de bases de la muestra AO2-6 de *Salmonella* spp.

CTACTTCTTTTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCA
CCGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCC
GGACTACGACGCACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTGCGTTCTCTTTGTATGCGCCATTGT
AGCACGTGTGTAGCCCTGGTTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCAGTTTA
TCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCTGACCTAATCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTG
CGGGACTTAACCAACATTTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACAGTTCCC
GAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAGTTCTGTGGATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCAT
CGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGG
CCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAACCTCC
AAGTAGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCAC
CTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCGCCTTCGCCACCGGTATTCTCCAGATCTCTACGCATTTCC
ACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAA

Esta secuencia de bases fue sometida al análisis bioinformático comparándola con los genomas completos de *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhi y *Salmonella* Paratyphi. Las puntuaciones de la comparación con las cuatro serovares de *Salmonella*, indican que pertenecen al género *Salmonella* con puntuaciones mayores a 200. Según referencia, la *Salmonella* Typhimurium LT2 tiene la mayor puntuación de coincidencias (1434).



Descriptions

| Sequences producing significant alignments: | | Score | E |
|---|--|-------|-----|
| ref NC_003197.1 | S.typhimurium LT2, complete genome | 1434 | 0.0 |
| ref NC_004631.1 | S.enterica subsp. enterica serovar Typhi | 1411 | 0.0 |

ref|NC_011294.1| S.enterica subsp. enterica serovar Enteritidis 1400 0.0
ref|NC_011147.1| S.enterica subsp. enterica serovar Paratyphi 1373 0.0

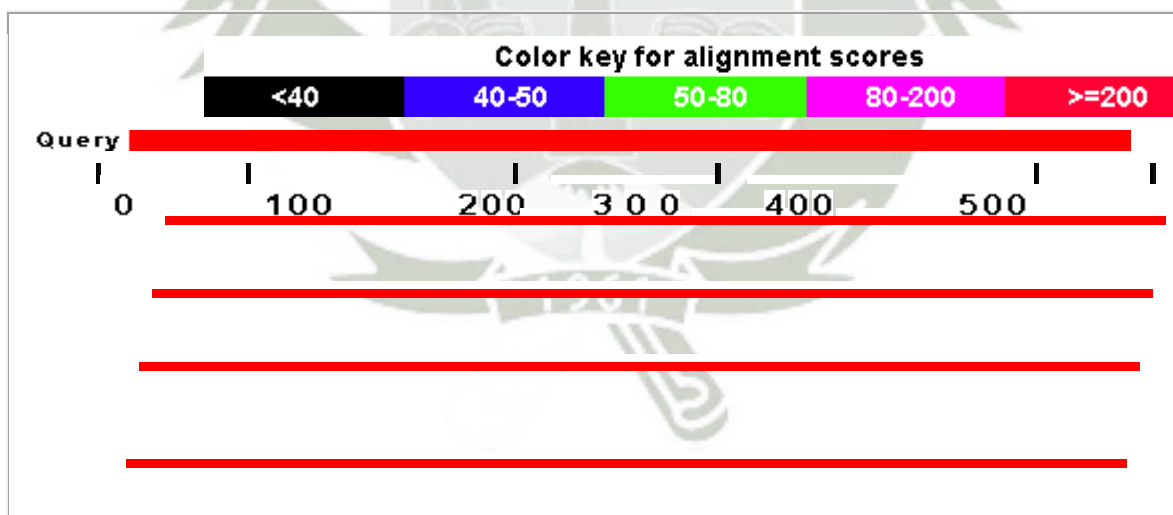
D Salmonella typhimurium LT2, complete genome
Length=4857432
Features in this part of subject sequence:
rRNA-16S ribosomal RNA
Score = 1434 bits (776), Expect = 0.0
Identities = 778/780 (99%), Gaps = 0/780 (0%)
Strand=Plus/Plus

| | | | |
|-------|---------|---|---------|
| Query | 3 | CTACTTCTTTTGAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAAC | 62 |
| | | | |
| Sbjct | 2800223 | CTACTTCTTTTGAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAAC | 2800282 |
| Query | 63 | GTATTACCGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGT | 122 |
| | | | |
| Sbjct | 2800283 | GTATTACCGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGT | 2800342 |
| Query | 123 | TGCAGACTCCAATCCGGACTACGACGCACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCG | 182 |
| | | | |
| Sbjct | 2800343 | TGCAGACTCCAATCCGGACTACGACGCACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCG | 2800402 |
| Query | 183 | CTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGTCGTAAGGGCCATGATGA | 242 |
| | | | |
| Sbjct | 2800403 | CTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGTCGTAAGGGCCATGATGA | 2800462 |
| Query | 243 | CTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGAC | 302 |
| | | | |
| Sbjct | 2800463 | CTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGAC | 2800522 |
| Query | 303 | CTAATCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTT | 362 |
| | | | |
| Sbjct | 2800523 | CTAATCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTT | 2800582 |
| Query | 363 | ACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACAGTTCCCGAAGGCACCAATC | 422 |
| | | | |
| Sbjct | 2800583 | ACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACAGTTCCCGAAGGCACCAATC | 2800642 |
| Query | 423 | CATCTCTGGAAAGTTCTGTGGATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAAT | 482 |
| | | | |
| Sbjct | 2800643 | CATCTCTGGAAAGTTCTGTGGATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAAT | 2800702 |
| Query | 483 | TAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTGAGTTTAACTTTG | 542 |
| | | | |
| Sbjct | 2800703 | TAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTGAGTTTAACTTTG | 2800762 |
| Query | 543 | CGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGG | 602 |
| | | | |
| Sbjct | 2800763 | CGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGG | 2800822 |
| Query | 603 | CACAACCTCCAAGTAGACATCGTTTACGGCGTGNACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTG | 662 |
| | | | |
| Sbjct | 2800823 | CACAACCTCCAAGTAGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTG | 2800882 |
| Query | 663 | CTCCCCACGCTTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGG | 722 |
| | | | |
| Sbjct | 2800883 | CTCCCCACGCTTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGG | 2800942 |
| Query | 723 | TATTCCTCCNGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAA | 782 |
| | | | |
| Sbjct | 2800943 | TATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAA | 2801002 |

2.2.1.2. Secuencia de bases de la muestra AO2-7 de Salmonella spp.

GCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGTCGTAAGGGC
CATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGACC
TAATCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTTACAACACG
AGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTACAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTC
TGTGGATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCCACATGCTCCACCGCTTGT
GCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTAACTTGC GGCCGTA CCCCAGGCGGTCTACTTAACGC
GTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAACCTCCAAGTAGACATCGTTTACGGCGTGGACTAC
CAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCG
CCTTCGCCACCGGTATTCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCT

Esta secuencia de bases fue sometida al análisis bioinformático comparando con los genomas completos de *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Tiphys y *Salmonella* Paratyphi. Las puntuaciones de la comparación con las cuatro especies de *Salmonella*, nos indica que pertenecen al género *Salmonella* con puntuaciones mayores a 200. Según la referencia S. Typhimurium LT2 tiene la mayor puntuación de coincidencias (1092).



Descriptions

Sequences producing significant alignments:

| | | Score (Bits) | E Value |
|----------------------------------|--|-----------------|------------|
| ref NC_003197.1 | S.typhimurium LT2, complete genome | 1092 | 0.0 |
| ref NC_004631.1 | S.enterica subsp. enterica serovar Typhi | 1070 | 0.0 |
| ref NC_011294.1 | S.enterica subsp. enterica serovar Enteritidis | 1059 | 0.0 |
| ref NC_011147.1 | S.enterica subsp. enterica serovar Paratyphi. | 1031 | 0.0 |

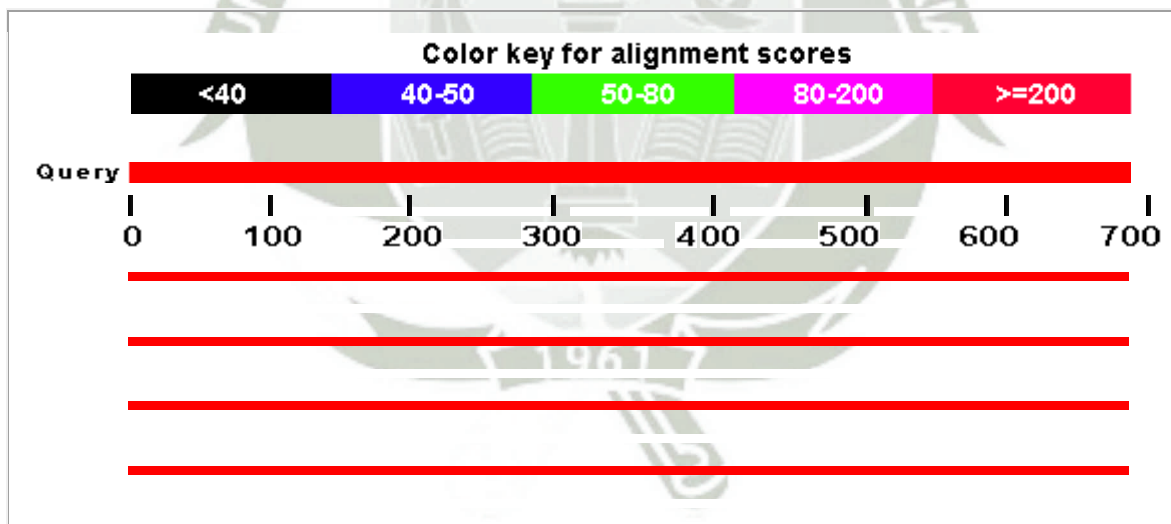
D Salmonella typhimurium LT2, complete genome
Length=4857432
Features in this part of subject sequence:
[rRNA-16S ribosomal RNA](#)
Score = 1092 bits (591), Expect = 0.0
Identities = 592/593 (99%), Gaps = 0/593 (0%)
Strand=Plus/Plus

| | | |
|---------------|---|---------|
| Query 1 | GCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGTTCG | 60 |
| | | |
| Sbjct 2800388 | GCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGTTCG | 2800447 |
| Query 61 | TAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTC | 120 |
| | | |
| Sbjct 2800448 | TAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTC | 2800507 |
| Query 121 | CTTTGAGTTCCCGACCTAATCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGAC | 180 |
| | | |
| Sbjct 2800508 | CTTTGAGTTCCCGACCTAATCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGAC | 2800567 |
| Query 181 | TTAACCCAAACATTTTCAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACAGTTC | 240 |
| | | |
| Sbjct 2800568 | TTAACCCAAACATTTTCAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACAGTTC | 2800627 |
| Query 241 | CCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTGTGGATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTT | 300 |
| | | |
| Sbjct 2800628 | CCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTGTGGATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTT | 2800687 |
| Query 301 | CGCGTTGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCATT | 360 |
| | | |
| Sbjct 2800688 | CGCGTTGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCATT | 2800747 |
| Query 361 | TGAGTTTTAACCTTGCGGGCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTAACGCGTTAGCTCCGGAA | 420 |
| | | |
| Sbjct 2800748 | TGAGTTTTAACCTTGCGGGCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTAACGCGTTAGCTCCGGAA | 2800807 |
| Query 421 | GCCACGCCCTCAAGGGCACAACCTCCAAGTAGACATCGTTTACGGCGTGNACTACCAGGGT | 480 |
| | | |
| Sbjct 2800808 | GCCACGCCCTCAAGGGCACAACCTCCAAGTAGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGT | 2800867 |
| Query 481 | ATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGC | 540 |
| | | |
| Sbjct 2800868 | ATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGC | 2800927 |
| Query 541 | CGCCTTCGCCACCGGTATTCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCT | 593 |
| | | |
| Sbjct 2800928 | CGCCTTCGCCACCGGTATTCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCT | 2800980 |

2.2.1.3. Secuencia de bases de la muestra AO2-8 de salmonella spp.

GTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGC
GATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACGCACTTTATGAGGTCCGCT
TGCTCTCGCGAGGTGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGTCGTAAGGG
CCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGAC
CTAATCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAACAC
GAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGT
TCTGTGGATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTT
GTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTAACTTGC GGCGGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTAAC
GCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAACCTCCAAGTAGACATCGTTTACGGCGTGGACT
ACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGC
CGCCTTCGCCACCGGTATTCTCC

Esta secuencia de bases fue sometida al análisis bioinformático comparando con los genomas completos de *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Tiph y *Salmonella* Paratyphi. Las puntuaciones de la comparación con las cuatro especies de *Salmonella*, nos indica que pertenecen al género *Salmonella* con puntuaciones mayores a 200. Según la referencia S. Typhimurium LT2 tiene la mayor puntuación de coincidencias (1293).



Descriptions

| Sequences producing significant alignments: | | Score | E Value |
|---|--|--------|---------|
| | | (Bits) | |
| ref NC_003197.1 | S.typhimurium LT2, complete genome | 1293 | 0.0 |
| ref NC_004631.1 | S.enterica subsp. enterica serovar Typhi | 1271 | 0.0 |
| ref NC_011294.1 | S.enterica subsp. enterica serovar Enteritidis | 1260 | 0.0 |
| ref NC_011147.1 | S.enterica subsp. enterica serovar Paratyphi A | 1232 | 0.0 |

D Salmonella typhimurium LT2, complete genome
Length=4857432
Features in this part of subject sequence:
[rRNA-16S ribosomal RNA](#)

Score = 1293 bits (700), Expect = 0.0
Identities = 700/700 (100%), Gaps = 0/700 (0%)
Strand=Plus/Plus

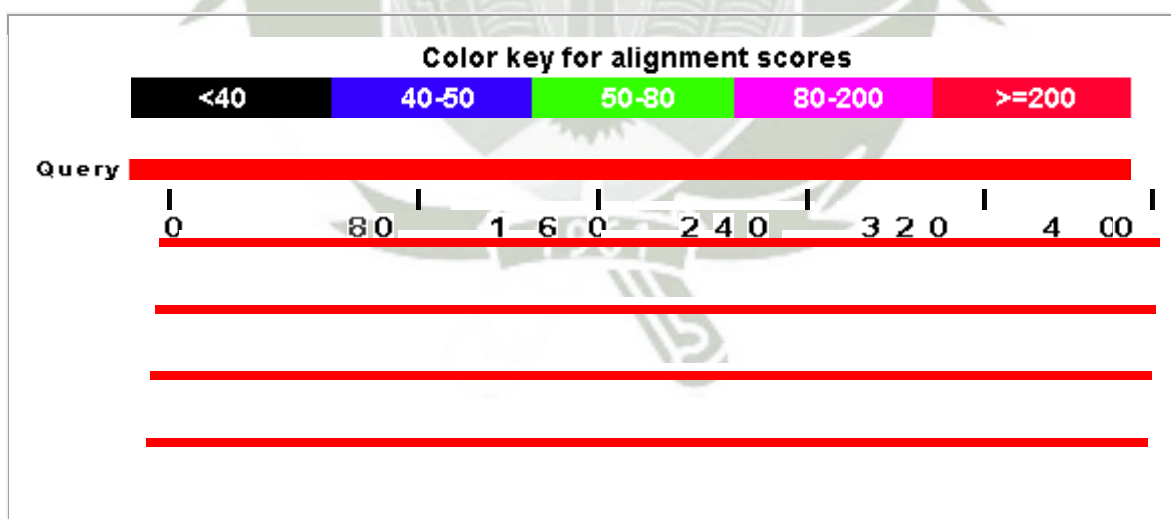
| | | | |
|-------|---------|--|---------|
| Query | 1 | GTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGTATTACCGTGGCATTCTGATCCACGAT | 60 |
| | | | |
| Sbjct | 2800252 | GTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGTATTACCGTGGCATTCTGATCCACGAT | 2800311 |
| Query | 61 | TACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACGCAC | 120 |
| | | | |
| Sbjct | 2800312 | TACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACGCAC | 2800371 |
| Query | 121 | TTTATGAGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCACG | 180 |
| | | | |
| Sbjct | 2800372 | TTTATGAGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCACG | 2800431 |
| Query | 181 | TGTGTAGCCCTGGTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCACCTTCCTCCAGTT | 240 |
| | | | |
| Sbjct | 2800432 | TGTGTAGCCCTGGTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCACCTTCCTCCAGTT | 2800491 |
| Query | 241 | TATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGACCTAATCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTT | 300 |
| | | | |
| Sbjct | 2800492 | TATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGACCTAATCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTT | 2800551 |
| Query | 301 | GCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGC | 360 |
| | | | |
| Sbjct | 2800552 | GCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGC | 2800611 |
| Query | 361 | ACCTGTCTCACAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTGTGGATGTCAAG | 420 |
| | | | |
| Sbjct | 2800612 | ACCTGTCTCACAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTGTGGATGTCAAG | 2800671 |
| Query | 421 | ACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGG | 480 |
| | | | |
| Sbjct | 2800672 | ACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGG | 2800731 |
| Query | 481 | CCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCAGGCGGTCTACTTAA | 540 |
| | | | |
| Sbjct | 2800732 | CCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCAGGCGGTCTACTTAA | 2800791 |
| Query | 541 | CGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAACTCCAAGTAGACATCGTTTACGG | 600 |
| | | | |
| Sbjct | 2800792 | CGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAACTCCAAGTAGACATCGTTTACGG | 2800851 |
| Query | 601 | CGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAG | 660 |
| | | | |
| Sbjct | 2800852 | CGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAG | 2800911 |
| Query | 661 | TCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCTCC | 700 |
| | | | |
| Sbjct | 2800912 | TCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCTCC | 2800951 |

Final del formulario

2.2.1.4. Secuencia de bases de la muestra AO2-9 de salmonella spp.

ACGACGCACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCAC
GTGTGTAGCCCTGGTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCAGTTTATCACT
GGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCCTAACCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGG
ACTTAACCCAACATTTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACAGTTCCCGAAG
GCACAAATCCATCTCTGGATTCTTCTGTGGATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAA
TTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTCGGGGCCCCCGTCAATTCAATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGT
ACTCCCCAGGCGGTCTACTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAACCTCCAAGT
AGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGA
GCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCTCCAGATCTCTACGCATTTACCG
CTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCAAGCCTGCCAGTTTCGAATGCAGTTCCAGGTT
GAGCCCGGGGATTTACATCCGACTTGACAGACCGCCTGCGTGCGCTTACGCCAGTAATTCCGAT
TAACGCTTGACACCTCCGTATTACGCGGCTGCTGGCACGGAGT

Esta secuencia de bases sometida a análisis bioinformático comparando con los genomas completos de *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Tiph*y y *S. Paratyphi*. Las puntuaciones de la comparación con las cuatro especies de *Salmonella*, nos indica que pertenecen al género *Salmonella* con puntuaciones mayores a 200. Según la referencia *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *enteritidis*, tiene la mayor puntuación de coincidencias (798).



Descriptions

| Sequences producing significant alignments: | | Score (Bits) | E Value |
|---|--|-----------------|------------|
| ref NC_011294.1 | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>enteritidis</i> | 798 | 0.0 |
| ref NC_003197.1 | <i>Salmonella typhimurium</i> LT2, complete genome | 787 | 0.0 |
| ref NC_004631.1 | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhi</i> | 765 | 0.0 |
| ref NC_011147.1 | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Paratyphi</i> | 743 | 0.0 |

D *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis str.
P125109, complete genome
Length=4685848
Features in this part of subject sequence:
threonine operon leader peptide (artificial fragment)
rRNA-16S ribosomal RNA
Score = 798 bits (432), Expect = 0.0
Identities = 432/432 (100%), Gaps = 0/432 (0%)
Strand=Plus/Minus

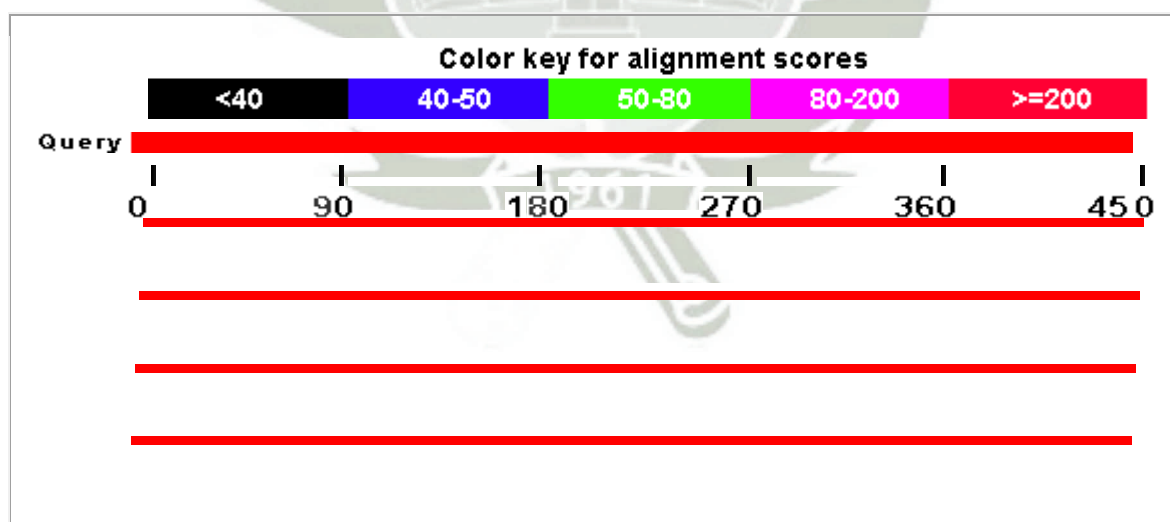
| | | | |
|-------|--------|---|--------|
| Query | 1 | GTAGCACGTGTGTAGCCCTGGTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTC | 60 |
| | | | |
| Sbjct | 295427 | GTAGCACGTGTGTAGCCCTGGTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTC | 295368 |
| Query | 61 | CTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCTAACCCTGGCAACAAAGGA | 120 |
| | | | |
| Sbjct | 295367 | CTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCTAACCCTGGCAACAAAGGA | 295308 |
| Query | 121 | TAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTTACAACACGAGCTGACGACAGC | 180 |
| | | | |
| Sbjct | 295307 | TAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTTACAACACGAGCTGACGACAGC | 295248 |
| Query | 181 | CATGCAGCACCTGTCTCACAGTTCCCGAAGGCACAAATCCATCTCTGGATTCTTCTGTGG | 240 |
| | | | |
| Sbjct | 295247 | CATGCAGCACCTGTCTCACAGTTCCCGAAGGCACAAATCCATCTCTGGATTCTTCTGTGG | 295188 |
| Query | 241 | ATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCT | 300 |
| | | | |
| Sbjct | 295187 | ATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCT | 295128 |
| Query | 301 | TGTGCGGGCCCCCGTCAATTCAATTTGAGTTTAAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGT | 360 |
| | | | |
| Sbjct | 295127 | TGTGCGGGCCCCCGTCAATTCAATTTGAGTTTAAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGT | 295068 |
| Query | 361 | CTACTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAACCTCCAAGTAGACATC | 420 |
| | | | |
| Sbjct | 295067 | CTACTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAACCTCCAAGTAGACATC | 295008 |
| Query | 421 | GTTTACGGCGTG 432 | |
| | | | |
| Sbjct | 295007 | GTTTACGGCGTG 294996 | |

Final del formulario

2.2.1.5. Secuencia de bases de la muestra AO2-10 de salmonella spp.

GCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGTCGTAAGGGC
CATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGACC
TAATCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAACACG
AGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTC
TGTGGATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGT
GCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTAACGC
GTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAACCTCCAAGTAGACATCGTTTACGGCGTGGCTCTC
GCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGTCGTAAGGGCCATGAT
GACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGACCTAATCG
CTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAACACGAGCTGA
CGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCGTGGA
TGCAAGACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGC
CCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTAACGCGTTAGC
TCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAACCTCCAAGTAGACATCGTTTACGGCGTG

Esta secuencia de bases sometida a análisis bioinformático comparando con los genomas completos de *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Tiph*y y *S. Paratyphi*. Las puntuaciones de la comparación con las cuatro especies de *Salmonella*, nos indica que pertenecen al género *Salmonella* con puntuaciones mayores a 200. Según la referencia *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* LT2, tiene la mayor puntuación de coincidencias (865).



Descriptions

| Sequences producing significant alignments: | | Score (Bits) | E Value |
|---|---|-----------------|------------|
| ref NC_003197.1 | <i>Salmonella typhimurium</i> LT2, complete genome | 865 | 0.0 |
| ref NC_004631.1 | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi | 843 | 0.0 |

ref|NC_011294.1| Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis 832 0.0
ref|NC_011147.1| Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi. 804 0.0

D Salmonella typhimurium LT2, complete genome
Length=4857432

Features in this part of subject sequence:

rRNA-16S ribosomal RNA

Score = 865 bits (468), Expect = 0.0

Identities = 468/468 (100%), Gaps = 0/468 (0%)

Strand=Plus/Plus

| | | | |
|-------|---------|---|---------|
| Query | 1 | GCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTAGCCCTGGTCG | 60 |
| | | | |
| Sbjct | 2800388 | GCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTAGCCCTGGTCG | 2800447 |
| Query | 61 | TAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTC | 120 |
| | | | |
| Sbjct | 2800448 | TAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTC | 2800507 |
| Query | 121 | CTTTGAGTTCCCGACCTAATCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGAC | 180 |
| | | | |
| Sbjct | 2800508 | CTTTGAGTTCCCGACCTAATCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGAC | 2800567 |
| Query | 181 | TTAACCCAAACATTTACAAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACAGTTC | 240 |
| | | | |
| Sbjct | 2800568 | TTAACCCAAACATTTACAAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACAGTTC | 2800627 |
| Query | 241 | CCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTGTGGATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTT | 300 |
| | | | |
| Sbjct | 2800628 | CCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTGTGGATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTT | 2800687 |
| Query | 301 | CGCGTTGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATT | 360 |
| | | | |
| Sbjct | 2800688 | CGCGTTGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATT | 2800747 |
| Query | 361 | TGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTAACGCGTTAGCTCCGGAA | 420 |
| | | | |
| Sbjct | 2800748 | TGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTAACGCGTTAGCTCCGGAA | 2800807 |
| Query | 421 | GCCACGCCTCAAGGGCACAACCTCCAAGTAGACATCGTTTACGGCGTG | 468 |
| | | | |
| Sbjct | 2800808 | GCCACGCCTCAAGGGCACAACCTCCAAGTAGACATCGTTTACGGCGTG | 2800855 |

Tabla 4. Resumen de los resultados de genotipificación de muestras de ADN de cuyes provenientes de la Región Arequipa. 2008

| Nº de Muestra | Score (Bites) | Porcentaje de alineación | Errores de alineación (Gaps) | Enterobacteria |
|---------------|---------------|--------------------------|------------------------------|----------------|
| A02-6 | 1434 | 99% | 0% | S. Typhimurium |
| A02-7 | 1092 | 99% | 0% | S. Typhimurium |
| A02-8 | 1293 | 100% | 0% | S. Typhimurium |
| A02-9 | 798 | 100% | 0% | S. Enteritidis |
| A02-10 | 865 | 100% | 0% | S. Typhimurium |

Los resultados de la tabla 4., indican que genotípicamente el 80% de los aislamientos de *Salmonellas* provenientes de casos clínicos, corresponden al genotipo de *Salmonella* Typhimurium LT2 y el 20% de las muestras genotipadas corresponden a *Salmonella* Enteritidis).

III. DISCUSIÓN

El Género *Salmonella* es reconocido por Approved Lists of Bacterial Name; sin embargo, no hay acuerdo para la especie, subespecie y serovariedades. En el presente estudio, se ha decidido utilizar la Opinión Judicial 80 que es el último dictamen de la Comisión Judicial de la Judicial Commission of the International Committee on the Systematics of Prokaryotes (11), que reconoce en el Género *Salmonella* dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*.

La *Salmonella enterica subsp. Enterica*, comprende las serovariedades: Arizonae, Cholerasuis, Enteritidis, Typhi y Typhimurium. Como las serovariedades no tienen nivel taxonómico de especie, sus nombres no siguen las reglas del “International Code of Nomenclature of Bacteria”, de manera que sus nombres se deben escribir en letras romanas (no itálicas) y con mayúscula; por ejemplo el nombre completo de *Salmonella Typhimurium* es *Salmonella enterica subsp. enterica* serovariedad Typhimurium. Como este nombre es muy largo, a los fines prácticos se utiliza *Salmonella Typhimurium*.

3.1. Perfil bioquímico y Serotipificación:

El perfil bioquímico confirma la identidad del Género *Salmonella* frente a otras enterobacterias que hayan podido ser aisladas en los medios selectivos. La determinación del perfil bioquímico se establece como técnica de identificación, ya que se trata de una característica distintiva y “estable”, capaz de diferenciar a la mayoría de géneros del grupo de las enterobacterias (12).

En los laboratorios de diagnóstico veterinario de Arequipa y del Perú, rutinariamente se lleva a cabo el aislamiento e identificación de *Salmonella* spp., mediante las características fenotípicas (cultivo, antibiorresistencia, serotipificación e identificación bioquímica). Sin embargo, la *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Enteritidis, no presentan diferencias en la prueba de agar TSI y agar urea. Entonces, el uso del perfil bioquímico, como marcador epidemiológico de cepas queda descartado, precisamente por la gran estabilidad dentro de las sub especies de *Salmonella*. Además, la serotipificación no es específica, requiere de laboratorios especializados y no es muy relevante para estudios epidemiológicos (13). Los resultados de ELISA indican que no sería recomendable utilizar los kits comerciales existentes en el mercado para monitoreos serológicos a nivel de escala en aves.

3.2. Resistencia antibacteriana

Según Otero (14), los antibióticos son metabolitos secundarios producidos por microorganismos que inhiben o destruyen, a bajas concentraciones, el crecimiento de otros microorganismos. La mayoría de los antibióticos útiles son producidos por mohos y bacterias del género *Streptomyces*, se diferencian de los quimioterápicos en que estos son de origen sintético. Ambos conceptos se unifican bajo la denominación de antimicrobianos (ATM) entendiéndose como tales, a toda sustancia con toxicidad selectiva sobre microorganismos patógenos en general. El CLSI en función de la concentración inhibitoria mínima (CMI) de un agente bacteriano, las bacterias pueden clasificarse en 3 categorías: i) sensible, cuando su CMI es inferior al “punto de corte”, ii)

intermedia, tienen una respuesta impredecible al tratamiento y, iii) resistente, cuando la CMI superior a un valor dado.

Las cepas de *Salmonella Typhimurium* aisladas de casos clínicos de cuyes recepcionados en el Laboratorio Veterinario del Sur – LABVETSUR, durante el periodo 2005-2006, evidencian un porcentaje muy variado de resistencia, cuando son sometidas a antibióticos betalactámicos (Ampicilina, Amoxicilina, Cefalosporinas de III y IV generación); Aminoglucósidos (Estreptomicina, Neomicina y Gentamicina); Fluoroquinolonas (Enrofloxacin, Ciprofloxacina y Norfloxacina); Tetraciclinas (Oxitetraciclina); Sulfonamidas y otros (Cloranfenicol, Sulfatrimetropin y Furazolidona).

3.2.1. Resistencia a betalactámicos

Los resultados del estudio indican que hay un incremento en la resistencia de *Salmonella Typhimurium* a los beta-lactámicos, con excepción de la Ampicilina. La mayor parte de las cepas de enterobacterias producen una betalactamasa clase I, que causa resistencia a casi todos los antibióticos betalactámicos. El gen estructural que codifica la *AmpC* betalactamasa está bajo control del gen *AmpR*. Este último codifica una proteína posiblemente asociada con el ADN del *AmpC* (15). Los antibióticos Ampicilina y Cefquinonas, son de primera elección para el tratamiento de salmonelosis en cuyes.

En el caso de la Ampicilina, la alta sensibilidad de las cepas de *Salmonella Typhimurium* aisladas de cuyes con signos clínicos de salmonelosis, sería debido a la ausencia de una beta-lactamasa tipo TEM, cuyo gene que la codifica se localiza en un plásmido conjugativo. Una betalactamasa

recombinante selectiva (BLRS) ha sido recientemente desarrollada para superar los efectos adversos de la ampicilina (16).

3.2.2. Resistencia a Fluoroquinolonas

La resistencia de *Salmonella* a las Fluoroquinolonas es un proceso complejo. Existen en la naturaleza muchas cepas resistentes al ácido nalidíxico, pero muy pocas que presenten resistencia elevada a las Fluoroquinolonas. Generalmente estas cepas presentan mutaciones en *gyrA*, aunque también están implicados mecanismos que disminuyen la acumulación de Fluoroquinolonas en la bacteria (17, 18, 19). Los tratamientos con fármacos antimicrobianos es un factor de riesgo para la infección con *Salmonella* Typhimurium R-ACSSuT tipo multirresistente. La resistencia a quinolonas en *Salmonella* Typhimurium se asocia con mayor riesgo de enfermedad invasiva y exceso de mortalidad (20).

La Ciprofloxacina y la Enrofloxacin serían los antibióticos de segunda elección para el tratamiento de Salmonelosis, con excepción de la Norfloxacina que tiene 75% de resistencia.

3.2.3. Resistencia a Aminoglucósidos

En bacterias de la Familia *enterobacteriaceae*, se han descrito los genes *arma* que codifican metilasas, que se localizan en plásmidos conjugativos y confieren resistencia a la Gentamicina (21). El perfil de las cepas de *Salmonella* Typhimurium de aislamientos clínicos, son poco resistentes a la Gentamicina (9.5%) y Neomicina (8%). Sin embargo, muestran alta resistencia a la Estreptomycin (59%).

3.2.4. Resistencia a Tetraciclinas

La causa principal de la resistencia de *Salmonellas* a las tetraciclinas, es debido a la adquisición de parte de las bacterias de genes *tet*. Hasta el 2006, se han caracterizado 29 genes de resistencia a Oxitetraciclina (*tet*) y 3 genes de resistencia a la Oxitetraciclina (*otr*). La mayoría de genes de resistencia a Tetraciclinas, están asociados a plásmidos móviles, transposones conjugativos e integrones. Estos elementos móviles han permitido que los genes de resistencia a Tetraciclinas hayan pasado de especie a especie y de género a género, mediante conjugaciones (21). De esta manera se explica que la resistencia de la *Salmonella spp.*, procedente de casos clínicos de cuyes, tengan una alta resistencia (34%) a la Oxitetraciclina.

3.2.5. Resistencia a Sulfamidados y combinaciones

La resistencia cromosómica a Sulfamidados puede ser debida al gen *dhps* que codifica una dihidrosintetasa resistente a la acción de las sulfamidas. También se han descrito, al menos 3 genes en plásmidos o integrones (Su II y Su III) codificadores de enzimas que implican modificación de la sintetasa y disminución de la permeabilidad (21).

La resistencia al Trimetropin se relaciona con múltiples factores que pueden ser cromosómicos o plásmidos. Más importantes es la presencia de plásmidos que poseen integrones donde se localiza el gen *dfr*. También puede deberse a cepas hiperproductoras de la enzima que agotan la capacidad de inhibición del fármaco o bien a alteraciones de la permeabilidad celular (21). La resistencia de *Salmonella spp.*, proveniente de casos clínicos de

salmonelosis en cuyes a los Sulfamidados es alta (40%) y la combinación de sulfametoxazole y trimetropin, baja la resistencia a un 15%.

3.2.6. Resistencia a otros antimicrobianos

Se ha considerado a la Furazolidona y al Cloranfenicol, ambos antimicrobianos con resistencias superiores al 30%. Son los menos específicos y en el caso del Cloranfenicol, la alta resistencia se debería a la producción de una Acetiltransferasa. Se han identificado varios genes; tales como, los genes *cat*, *cmlA*, *pp-flo*, *flor*, *etc.*, que tienen que ver con mecanismos de resistencia (21).

En el caso de la Furazolidona es un antimicrobiano que incluso actúa contra protozoarios, pero no es específico contra *Salmonella spp.*, aislada de cuyes con manifestaciones clínicas de salmonelosis.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto el riesgo potencial que representan las cepas bacterianas aisladas de de cuyes en la transmisión de resistencia a los antibióticos, con excepción de la ampicilina. Información similar la obtuvo Seepersadsingh (22), en cepas de *Salmonella* obtenidas de animales de compañía y pone de manifiesto el riesgo potencial para las personas que están en contacto con cuyes, como los propietarios, profesionales de la salud animal y faenadores.

Según los resultados de la prueba de antibiosensibilidad presentados en la tabla 5, y considerando el criterio de resistencia antimicrobiana, es posible presentar para la *Salmonella* Typhimurium, la siguiente clasificación:

- **Antibióticos muy efectivos:** (sensibilidad > al 90% y 0% de resistencia). La ampicilina.
- **Antibióticos efectivos:** (sensibilidad 75-89% y resistencia no mayor al 15%). La Ciprofloxacina, Gentamicina, Cefquinona, Enrofloxacin y Sulfatrimetropin
- **Antibióticos de mediana efectividad:** (sensibilidad 50-74% y resistencia del 16-25%). Neomicina, Amoxicilina y Ceftiofur.
- **Antibióticos de baja efectividad:** (sensibilidad < 50% y resistencia >25%). La Oxitetraciclina, Cloranfenicol, Furazolidona, Sulfamidados, Estreptomycin y Norfloxacin.

El análisis de un mayor número de cepas y la aplicación de técnicas de tipificación molecular en combinación con características fenotípicas y datos epidemiológicos permitirán nuevos aportes en este tema, que posee una manifiesta dimensión de salud pública con implicaciones económicas y sociales.

En medicina humana se considera que en los bacilos Gram negativos que causan diarrea, los mecanismos de resistencia bacteriana más común son: inhibición enzimática, alteraciones de la membrana bacteriana y alteración de sitios blanco como los ribosomas, los precursores de la pared y las enzimas. Existen varios cambios genéticos que pueden presentarse en la evolución bacteriana: Una mutación puntual que ocurre en un par de bases; un segundo cambio que resultaría en un rearrreglo del material genético en grandes segmentos de ADN en un solo evento, y finalmente, un tercer cambio que

involucraría la adquisición de ADN extraño transportado por plásmidos, bacteriófagos o transposones. Estos cambios permiten a la bacteria adquirir un número ilimitado de mecanismos de resistencia. Una vez que aparece, un gen de resistencia puede diseminarse a otras bacterias por transformación, transducción, conjugación o transposición. Causa preocupación la cepa de *Salmonella* conocida como DT 104 porque presenta multirresistencia a Ampicilina, Cloranfenicol, Estreptomicina, sulfonamidas y a Tetraciclina - ACSSuT (23) y en las cepas secuenciadas no hay evidencia de pentarresistencia porque la resistencia a la Ampicilina es cero.

Hoy en día, preocupa el riesgo potencial que se puede inducir por el uso terapéutico de compuestos antimicrobianos en la especie *Cavia porcellus* (cuyes) como animales productores de alimentos por su eventual contribución a una presión selectiva sobre los microorganismos del tracto intestinal, que a su vez pueden conducir a serias implicaciones para la salud. De otro lado, el conocimiento de la probabilidad de resistencias a fármacos comúnmente disponible podría ser de gran valor para el clínico.

3.3. GENOTIPIFICACION

El genoma completo de *Salmonella* Typhimurium cepa LT2 (colección de tipo americano de la cultura, ATCC, número 700720), fue publicado por McClellan (24) y permite hacer comparaciones, con los resultados de secuencias de bases de las muestras obtenidas en LABVETSUR, mediante BLAST en el Gene Bank.

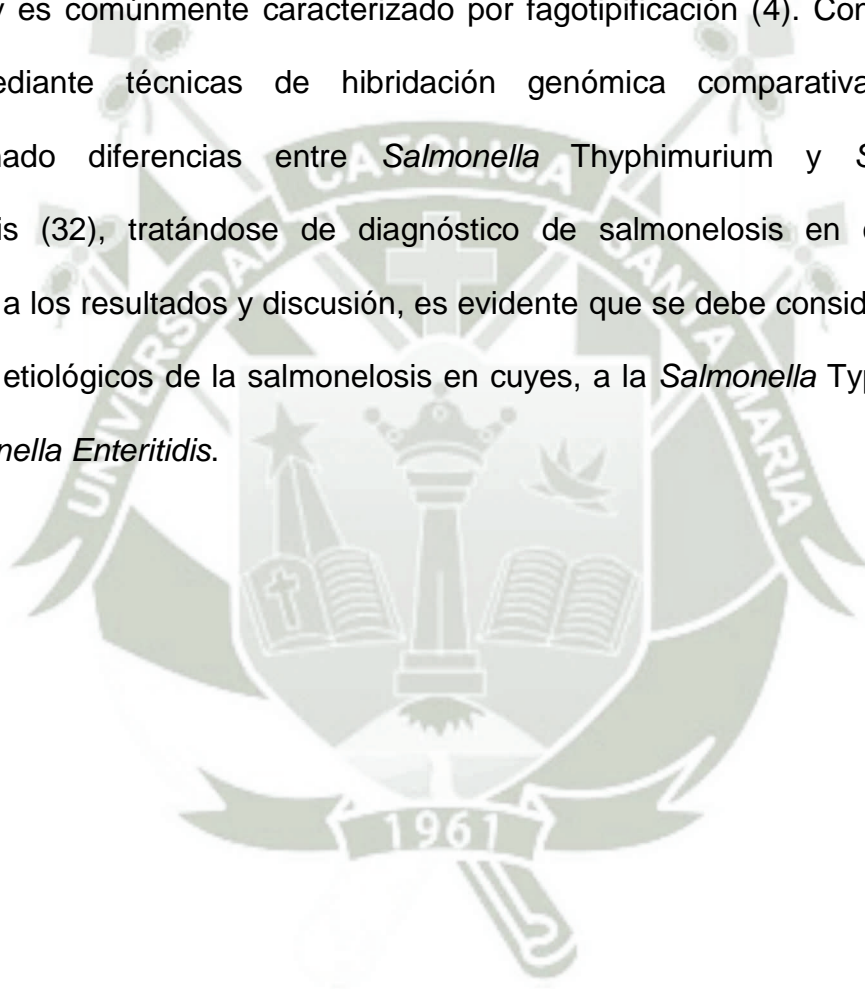
En un intento por mejorar la clasificación serológica que usa el esquema Kauffmann-White, muchos métodos moleculares se han aplicado para tipificar o

para caracterizar las serovariedades de *Salmonella* (25, 26). Sin embargo, estos métodos no proporcionan suficiente poder discriminativo para todos los serovares de las *Salmonellas* y están disponibles solo en algunos laboratorios de referencia. Los métodos Microarrays parecen subdividir los serovares de *Salmonella* con exactitud, pero es demasiado costoso perfilar 2.500 serovares y solo es posible hacerlo en un laboratorio especializado. En cambio, PCR tiene el potencial para convertirse en una alternativa de gran alcance en los diagnósticos microbiológicos debido a su simplicidad, rapidez y exactitud (27, 28, 29).

De los resultados de la genotipificación de muestras de *Salmonella spp.*, provenientes de casos clínicos de salmonelosis en cuyes, podemos afirmar que hay dos agentes etiológicos: *Salmonella* Typhimurium cepa LT2 y *Salmonella* Enteritidis. Ambas especies son importantes en infecciones de origen alimentario por *Salmonella spp.*, siendo una de las causas más importantes de gastroenteritis en seres humanos. Los principales reservorios de estos microorganismos son animales portadores asintomáticos y las fuentes de infección más frecuente son los alimentos o sus productos derivados. El aumento de la incidencia de *Salmonella spp.*, es de gran impacto tanto en salud pública, como en salud animal y se ha relacionado con un incremento de la diseminación de los microorganismos a través de las cadenas productivas animales (bovinos, cerdos, pollos asaderos y en especial gallinas ponedoras), emergiendo como un agente etiológico importante en las intoxicaciones alimentarias a nivel mundial (30). Sin embargo, tratándose de carne de cuy, se añade una preocupación más al constituirse en un problema de producción animal y en salud pública.

La mayoría de estudios (31, 32, 33, 34, 8) señalan que la salmonelosis en cuyes, es causada por *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Enteritidis, identificadas fenotípicamente. Asimismo, Ramírez (34) indica que el 95% de aislamientos corresponde a *Salmonella* Typhimurium y la diferencia a *Salmonella* Enteritidis.

La *Salmonella* Enteritidis ha emergido como un patógeno alimentario través del mundo y es comúnmente caracterizado por fagotipificación (4). Considerando que mediante técnicas de hibridación genómica comparativa, se ha determinado diferencias entre *Salmonella* Thyphimurium y *Salmonella* Enteritidis (32), tratándose de diagnóstico de salmonelosis en cuyes, de acuerdo a los resultados y discusión, es evidente que se debe considerar como agentes etiológicos de la salmonelosis en cuyes, a la *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Enteritidis.

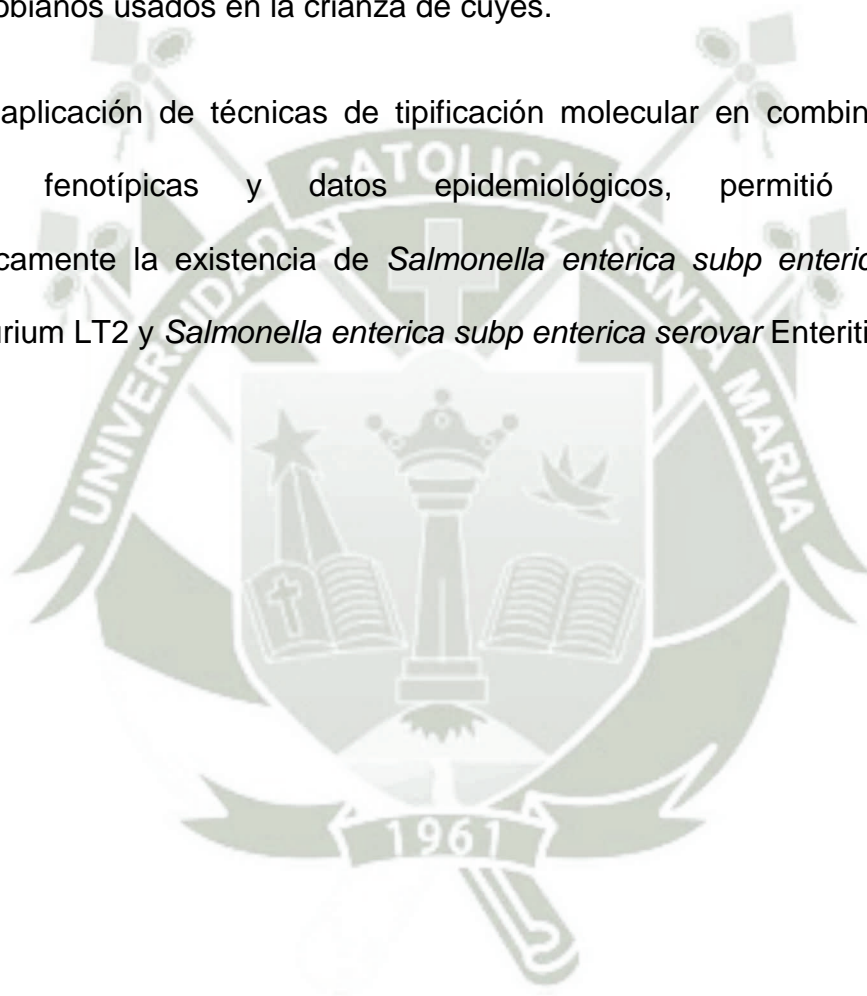


IV. CONCLUSIONES:

4.1. Los métodos de identificación fenotípica usados en el estudio permiten identificar al Genero *Salmonella*, pero no la especie.

4.2. Las cepas de *Salmonella* Typhimurium aisladas de casos clínicos de salmonelosis en cuyes, fueron total o parcialmente resistentes a principios antimicrobianos usados en la crianza de cuyes.

4.3. La aplicación de técnicas de tipificación molecular en combinación con técnicas fenotípicas y datos epidemiológicos, permitió confirmar genotípicamente la existencia de *Salmonella enterica subp enterica serovar* Typhimurium LT2 y *Salmonella enterica subp enterica serovar* Enteritidis.



V. RECOMENDACIONES

5.1. Desarrollar estudios para diferenciar la sintomatología de salmonelosis causada por *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Enteritidis. Así mismo, estudios para producir una vacuna que permita ofrecer carne de cuy inocua.

5.2. Los resultados de la genotipificación pueden ser utilizados para ampliar investigaciones sobre el comportamiento del huésped y estudios de epidemiología molecular.



VI. BIBLIOGRAFIA

1. Spotorno AE, Valladares JP, Marin JC, Zeballos H. Molecular diversity among domestic guinea-pigs (*Cavia porcellus*) and their close phylogenetic relationship with the Andean wild species *Cavia tschudii*. **Rev. chil. hist. nat.** [online]. 2004, vol.77, n.2 [citado 2009-10-22], pp. 243-250. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-078X2004000200004&lng=es&nrm=iso. ISSN. doi: 10.4067/S0716-078X2004000200004.
2. INDECOPI. NTP. 2001.058:2006. Carne y productos cárnicos: Definiciones, clasificación y requisitos de las carcasas de carne de cuy (*Cavia porcellus*). 1ª edición. Perú.
3. Bogaard AE Van Den, Stobberingh EE. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. **Int J Antimicrob Agents** 14. (4):327- 335.
4. World Health Organization. A WHO Global Salm-Surv Retrospective Study Examining *Salmonella* Serotypes in South America, 2000: Dominance of *Salmonella* Serotype enteritidis. International Conference on emerging Infectious Diseases, Atlanta, 2002.
5. Zaidi M, Hermosillo J, Zamora E. 2001.Conservación de cepas. En: Curso Internacional de Entrenamiento sobre Vigilancia de Salmonella y Resistencia Antimicrobiana en Patógenos Transmisibles por Alimentos. Fundación Mexicana para la salud. México. pp. 49-53.
6. Chauca L. Producción de cuyes (*Cavia porcellus*). Estudio FAO producción y sanidad animal 138. FAO, 1997.
7. Traverso S. Crianza de cuyes para exportación. Buscar en: http://www.cadenacuy.pe//imag_upload/f83e3a9675ef87012bc1a/crianzaDeCuyesParaExportación.pdf
8. Estupiñán E. (2006). La Salmonelosis en cuyes. Alma Mater 121. Carrera de Ciencias Agroambientales y Veterinarias. Universidad Técnica de Cotopaxi. Ecuador.

9. Hoofar J, Baggesen DL. (1998). Importance of pre-enrichment media for isolation of *Salmonella* spp from swine and poultry. **FEMS Microbiol lett** 169:125-130.
10. Ewing WH. Proposal for the validation of the species name *Salmonella arizonae* kauffmann and Edwards. Request for an Opinion. **International Journal of Systematic Bacteriology**. Vol. 16, No. 4 October 1966 pp. 423-426. Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, Communicable Disease Center Atlanta, Georgia.
11. Truper H. The type species of the genus *Salmonella* Lignieres 1900 is *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987, with the type strain LT2^T, and conservation of the epithet *enterica* in *Salmonella enterica* over all earlier epithets that may be applied to this species. Opinion 80. **Int J Syst Evol Microbiol** 55 (2005), 519-520; DOI 10.1099/ijs 0.63579-0.
12. Farmer JJ, Davis BR, Hickman-Brenner FW, McWhorter A, Huntley-Carter GP, Asbury MA, Riddle C, Wathen-Grady HG, Elias C, Fanning GR (1985) Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. **J Clin Microbiol** 21(1):46-76.
13. De La Torre M. Caracterización molecular y fenotípica como herramienta de marcaje epidemiológico para cepas de *Salmonella* de origen porcino. [Tesis Doctoral]. Fac. Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. Marzo 2006.
14. Otero P. Farmacología y Bases de la Terapéutica Veterinaria: Agentes Antimicrobianos Quimioterápicos. Rubén Hallú 1998; 4:71.
15. Livermore DM. Clinical Significance of Beta-Lactamase Induction and Stable Derepression in Gram-Negative Rods. **European Journal of Clinical Microbiology** 6:439-445, Ago 1987.
16. Mentula S, Harmoinen J, Koski P y colaboradores. Inhibition of Ampicillin-Induced Emergence of Resistance in Intestinal Coliforms by Targeted Recombinant Beta-Lactamase. **International Journal of Antimicrobial Agents** 24(6):555-561, Dic 2004.

17. Piddock LJ, Ricci V, McLaren I, Griggs, D.J. Role of mutation in the *gyrA* and *parC* genes of nalidixic-acid-resistant *Salmonella* serotypes isolated from animals in the United Kingdom. **J Antimicrob Chemother** 1998; 41: 635-641.
18. Threlfall EJ, Angulo FJ y Wall PG. 1998. Ciprofloxacin- resistant *Salmonella typhimurium* DT104. *The Veterinary Record*, 142, 255.
19. Reyna F, Huesca M, González V, Fuchs Y. 1995. *Salmonella typhimurium gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39, 1621-1623.
20. Morten H. 2005. Health Impact of Zoonotic *Salmonella* and Other Foodborne Bacterial Gastrointestinal Infections, with Particular reference to Antimicrobial Drug Resistance in *Salmonella Typhimurium*. [PhD thesis]. 2005. Department of Epidemiology Research Statens Serum Institut.
21. Cabrera R. 2008. Epidemiología y caracterización molecular de los mecanismos de resistencia a diversos agentes antimicrobianos en aislamientos clínicos de *salmonella sp.* [Tesis Doctoral]. Facultad de Medicina. Universidad de Barcelona. España.
22. Seepersadsingh N, Adesiyun A. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. in pet mammals, reptiles, fish aquarium water, and birds in Trinidad. **J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health**. Diciembre de 2003; 50 (10):488-93.
23. Briggs CE, Fratamico PM. 1999. Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella typhimurium* DT104. **Antimicrob Agents Chemother** 43:846-849.
24. McClelland M, Sanderson KE, Spieth J, Clifton SW, Latreille P, Courtney L, *et al.* Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. **Nature**. 2001 Oct. 25;413 (6858):852-6.
25. Davis LG, Dibner MD, Battey JF. 1986. Basics methods in molecular biology. Elsevier Science publishing Co, Inc. Amsterdam, The Netherlands.
26. Crosa JH, Brenner DJ, Ewing WH, Falkow S. Molecular relationships among the *Salmonellae*. **J Bacteriol**. 1973. 115(1):307-315.

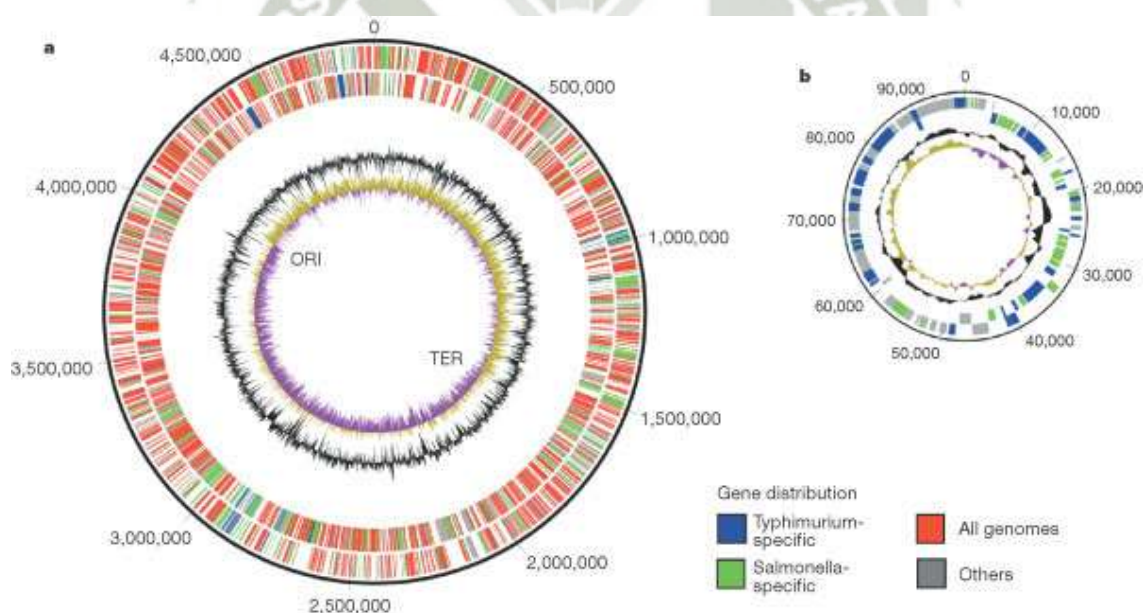
27. Kim H, Park S. Comparison of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium LT2 and Non-LT2 *Salmonella* Genomic Sequences, and Genotyping of Salmonellae by Using PCR. **Appl Environ Microbiol.** 2006 September; 72(9): 6142–6151.
28. Swaminathan B, Matar GM. Molecular typing methods: definition, applications, and advantages. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, eds. *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. Washington DC: American Society for Microbiology; 1993:26-50.
29. Tenover FC, Arbeit MD, Goering RV. How to Select and Interpret Molecular Strain Methods for Epidemiological Studies of Bacterial Infections: A Review for Healthcare Epidemiologists. **Infect Control and Hosp Epidemiology.** 1997.p.426-439.
30. Uribe C, Suárez M. Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. Volumen 37 N° 2, 2006 (Abril-Junio).
31. Cicogna M. 2000. Guide technique d'élevage N°04 sur. Les Cobayes. décembre 2000. editeur responsable: **j. hardouin, b.e.d.i.m., fusagx.** 5030 gembloux.
32. Olson AB, Andrysiak AK, Tracz DM, Guard-Bouldin J, Demczuk W, Ng LK, Maki A, Jamieson F, Gilmour MW. Limited genetic diversity in *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis PT13. **BMC Microbiol.** 2007 Oct 1;7(1):87.
33. Thomson NR, Clayton DJ, Windhorst D, et al. Comparative genome analysis of *Salmonella* Enteritidis PT4 and host adaptation pathways *Salmonella* Gallinarum 287/91. **Genome Res.** published online June 26, 2008.
34. Ramírez VLA. *Estudio bacteriológico y epidemiológico de un brote infeccioso en cobayos.* (Tesis de grado). Fac. Medicina Veterinaria. UNMSM, Lima, Perú. 1972.

VII. ANEXOS

7.1. Genoma de *Salmonella enterica subespecie enterica serovar Typhimurium LT2*.

Table 1 Genome essentials

| Parameter | Chromosome | Plasmid pSLT |
|-----------------------------|------------|--------------|
| Size (bp) | 4,857,432 | 93,939 |
| G+C content | 53% | 53% |
| rRNA clusters | 7 | 0 |
| tRNAs | 85 | 0 |
| tRNA pseudogene | 1 | 0 |
| Structural RNAs | 11 | 1 |
| CDS (including pseudogenes) | 4,489 | 108 |
| CDS pseudogenes | 39 | 6 |



a, El cromosoma. Los pares de bases se indican fuera del círculo externo. Los dos círculos externos representan la orientación de la codificación, con el filamento delantero en el exterior y el reverso en el interior.

El rojo indica homólogos cercanos en los ocho genomas. El verde indica genes con un homólogo cercano en por lo menos una que otra salmonella (*Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi A, *Salmonella* Paratyphi B,

Salmonella Arizonae, o *Salmonella* bongori); pero no en *Escherichia* Coli K12, *Escherichia* Coli O157: H7 y *K. pneumoniae*.

El azul indica los genes presentes solamente en *Salmonella* Typhimurium LT2.

El gris indica otras combinaciones.

El círculo interno negro es el contenido de G+C; el círculo interno púrpura/amarillo es el GC bias. Las posiciones del origen de la replicación (ORI) y del término (TER) se muestran.

b. El plásmido pSLT. Los pares de bases se indican fuera del círculo externo. El plásmido no está a escala. El esquema de colores es igual que para el cromosoma.

7.2. PROYECTO DE TESIS APROBADO

Título: Caracterización fenotípica y molecular del agente causal de salmonelosis en cuyes (*Cavia porcellus*) de Arequipa

I. Introducción

La crianza del cuy (*Cavia porcellus*) es un legado de las culturas pre-incas que se desarrollaron en los Andes Sudamericanos y posteriormente se han diseminado al mundo con los nombres de “Guinea pig”, “conejiño de indias”. Hoy en día, es fuente de proteínas para las poblaciones andinas de Perú, Bolivia y Ecuador constituyendo una alternativa de ingreso económico para familias de menores recursos de la Región Arequipa. Sin embargo, la crianza de cuyes requiere de mayores conocimientos científicos y tecnológicos, que le permita alcanzar los niveles de competitividad que demanda el mercado.

Como alimento cárnico para consumo de la población humana, debe alcanzar los estándares de inocuidad definidos en la Norma Técnica Peruana 201.058:2006 del INDECOPI, referida a carne y productos cárnicos de *Cavia porcellus* (cuy); por lo que, existe la necesidad de incorporar en el proceso de crianza, los conceptos de inocuidad alimentaria y de buenas prácticas de crianza de cuyes, para minimizar los riesgos de presentación de Salmonelosis en cuyes. Se requiere de investigaciones científicas orientadas a generar conocimientos sobre las características fenotípicas y genotípicas del agente etiológico de la Salmonelosis en cuyes; de tal manera, que se oferte al mercado un alimento inocuo. De otro lado, los cuyes tienen alta demanda como mascotas, constituyendo una posibilidad de transmitir la salmonelosis al hombre.

Los resultados del presente estudio permitirán definir, si la enfermedad es producida sólo por *Salmonella Typhimurium* o interviene otra especie. Así mismo, la sintomatología por agente etiológico y pensar en la elaboración de vacunas. La crianza de cuyes, también se beneficiará al disponer de información para el control epidemiológico de la salmonelosis en cuyes.

II. Planteamiento teórico

2.1. Problema de investigación

2.1.1. Enunciado del problema

En la literatura revisada hay escasa información científica sobre la caracterización fenotípica del agente causal de la salmonelosis en cuyes y no se ha encontrado información sobre su caracterización genotípica.

2.1.2. Descripción del problema

En el Perú, se ha identificado fenotípicamente a la *Salmonella* Typhimurium, como el agente causal de la salmonelosis en cuyes, mediante la caracterización del comportamiento de la bacteria en cultivos microbiológicos, la tipificación bioquímica, serología y las pruebas de antibiosensibilidad. Sin embargo, la literatura revisada no reporta estudios de identificación genotípica.

2.1.3. Justificación del problema

La salmonelosis en aves, porcinos y bovinos es una enfermedad inmunoprevenible que puede ser controlada aplicando conocimientos de diagnóstico, tratamiento y prevención. Así mismo, mejoras en el manejo de crianza. En la medida que se disponga de mayores conocimientos sobre la caracterización molecular, será posible la implementación de sistemas de control y vigilancia (programas de bioseguridad, programas de inmunizaciones, métodos de diagnóstico de alta sensibilidad y especificidad), con el fin de mantener centros de producción de cuyes libres de salmonelosis para la producción de carne inocua.

2.2. Marco conceptual

Para una mejor presentación y comprensión del marco conceptual se ha desarrollado una matriz de variables, sub variables, indicadores y pruebas de laboratorio.

Tabla 1.- Marco conceptual: variables, sub variables, indicadores y pruebas de laboratorio para la caracterización feno y genotípica del agente etiológico de *Cavia porcellus* (cuyes) en Arequipa.

| Variable | Sub variable | Indicadores | Pruebas de laboratorio |
|----------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|
| Caracterización fenotípica | Aislamiento de <i>Salmonella spp.</i> | Cepas de <i>salmonella spp.</i> | Cultivo Agar Sangre y Agar Mac Conkey |
| | Identificación bioquímica | Lactosa positiva y urea negativa | Pruebas Bioquímicas TSI y Urea |
| | Antibiosensibilidad | Sensibilidad y resistencia | Antibiograma |
| | Seroprevalencia | Tasa de anticuerpos | ELISA |
| | Serotipificación | Serotipos | Esquema de Kauffman-White |
| Caracterización genotípica | Genotipificación | Genotipo de <i>Salmonella</i> | PCR |

2.2.1. Caracterización fenotípica

La caracterización de cepas de *Salmonella* Typhimurium por tipificación fenotípica y genotípica (molecular), resulta vital para identificar los clones y reconstruir las vías de propagación (Mammina et al, 2000). Los métodos fenotípicos de caracterización bacteriana se basan en propiedades bioquímicas y fisiológicas expresadas por los microorganismos; tienen como limitación inherente, la capacidad de las bacterias para alterar la expresión de la característica estudiada debido a condiciones del cultivo o a mutaciones puntuales. A veces una fracción considerable de cepas es fenotípicamente no tipificable, lo cual dificulta la clasificación. Los métodos de caracterización fenotípica incluyen, determinación del perfil de las colonias, el perfil bioquímico, serotipificación y el perfil de resistencia a antibióticos (Swaminathan et al. 1993; Tenover, 1997).

2.2.1.1. Aislamiento de *Salmonella* spp.

Los estudios de caracterización fenotípica y genotípica, se inician con el aislamiento de *Salmonella* spp., mediante cultivos microbiológicos, que consisten en:

- Los medios de pre-enriquecimiento (agua de peptona tamponada - APT y el caldo universal-UB), son necesarios para muestras con una carga bacteriana presumiblemente baja (portadores sanos, animales tratados con antibióticos, muestras ambientales, muestras de la ampolla rectal, etc.). La eficacia de estos medios varía dependiendo de la capacidad tampón del medio de cultivo (Hoofar et al., 1998).

- El enriquecimiento en medios líquidos selectivos permite, de forma competitiva, la proliferación de *Salmonella* hasta niveles que la hacen detectable en medios sólidos aproximadamente 24 horas.
- Los medios sólidos selectivos y/o diferenciales para *Salmonella*, se basan en la inhibición del crecimiento de otras bacterias entéricas y en la observación visual de las colonias. A menudo se utilizan la producción de ácido sulfhídrico (H_2S) y la no fermentación de lactosa, como características diferenciales para dicha discriminación visual en medios de cultivo; tales como, agar Mac Conkey, agar verde brillante, novobiocina-glicerol-lactosa (NBGL), entre otros. Hay coincidencia que los mejores resultados de aislamiento se dan con cualquier medio, siempre y cuando se efectúe el proceso de enriquecimiento (Dusch *et al.*, 1995, Ruiz *et al.*, 1996, Gaillot *et al.*, 1999, Maddocks *et al.*, 2002).

2.2.1.2. Perfil bioquímico

La determinación del perfil bioquímico se ha establecido como técnica de identificación, porque es una característica distintiva y “estable”, capaz de diferenciar a la mayoría de géneros del grupo de las enterobacterias (Farmer *et al.* 1985). Tradicionalmente las pruebas bioquímicas se han llevado a cabo mediante una serie de medios específicos; tales como: TSI, citrato de Simons, SIM (sulfideindol-motility), ureasa, oxidasa, catalasa, Vogues-Proskauer, fenilalanina desaminasa; con el fin de detectar y visualizar en los medios de cultivo una serie de resultados claves en la identificación de *Salmonella*.

En general, el Género *Salmonella* no fermenta la lactosa, pero si la glucosa con producción de gas, genera ácido sulfhídrico (SH_2) y no produce desaminasas, ni ureasas (Jawetz *et al.*, 1985). El perfil bioquímico de *Salmonella spp.* es estable para la mayoría de los serotipos pertenecientes a los 7 subgrupos

identificados. El subgrupo I (subespecie *enterica*) tiene un perfil bioquímico típico caracterizado por utilizar al citrato como única fuente de carbono, y ser arginina dihidrolasa, lisina y ornitina positivo. En el subgrupo I, hay por lo menos 5 excepciones: los serotipos Typhi, Choleraesuis, Paratyphi A, Gallinarum y Pullorum. Significa que en la identificación bioquímica, se descarta 5 de los 7 subgrupos,

2.2.1.3. Perfil de antibiosensibilización:

Prueba de difusión (Método de Kirby-Bauer)

Es una prueba de sensibilidad, se utilizan discos de papel filtro impregnado con agentes antimicrobianos y colocados sobre la superficie de una caja o placa Petri con Agar, previamente inoculada con la bacteria a evaluar. Después de 12 horas de incubación, se miden las zonas de inhibición alrededor del disco y se interpreta como sensible, intermedio o resistente.

La aparición de resistencia a antibióticos en *Salmonella*, y otras bacterias zoonóticas, está ligada al uso y abuso de antibióticos como tratamiento terapéutico y promotor de crecimiento en el ganado (Witte, 1998, Schroeder *et al*, 2002). Esto ha producido una inevitable selección de cepas resistentes de la flora comensal y patógena de los animales. Posiblemente por ello, los niveles de antibiosensibilidad de la flora comensal del intestino en humanos se han visto también incrementados (Van den Bogaard *et al* 2000).

En la adquisición de resistencia frente a antimicrobianos están implicados numerosos mecanismos relacionados con elementos genéticos móviles (de transmisión horizontal: plásmidos, transposones e integrones, jugando estos un papel importante en su diseminación (Davies, 1994).

En estudios epidemiológicos es una práctica común establecer un perfil de antibiorresistencia que es sencilla, rápida y accesible para la caracterización de cepas de *Salmonella*. Un patrón similar de antibiorresistencia puede indicar cierta clonalidad, siempre y cuando las cepas en estudio sean geográficamente cercanas. Aunque las resistencias hayan sido transferidas de forma horizontal, se ha demostrado en *Salmonella* Typhimurium DT104 una integración de ciertas antibiorresistencia a nivel cromosómico (Threlfall *et al.*, 1994; Briggs *et al.*, 1999).

El método de Kyrby-Bauer es la prueba de sensibilidad seleccionada por ser muy útil en estudios epidemiológicos de resistencia y de nuevos agentes antimicrobianos (Schroeder *et al.*, 2002).

Existen tres categorías para la interpretación de las pruebas de susceptibilidad, comparando la concentración inhibitoria mínima del antibiótico con los puntos de corte establecidos: a) *Sensible*: cuando el microorganismo es capaz de responder al fármaco a la dosis recomendada; b) *Resistente*: cuando el microorganismo no responde al antibiótico cualesquiera que sean la dosis y la localización de la infección; b) *Intermedia*: corresponde a cepas con sensibilidad disminuida a un antibiótico pudiendo utilizarse con éxito para el tratamiento en dosis más altas por ser poco tóxico o porque se concentra en el sitio de infección; y cepas con sensibilidad intermedia a antibióticos que por ser muy tóxicos no pueden usarse en dosis más altas (Schroeder *et al.*, 2002). La información obtenida por el método de Kirby-Bauer ha revelado ser de una buena estabilidad y de calidad comparable a los métodos moleculares.

2.2.1.4. Prevalencia

En epidemiología se denomina prevalencia a la proporción de individuos de un grupo o una población que presentan una característica o evento determinado en un momento, o periodo de tiempo determinado ("prevalencia de periodo"). La prevalencia de una enfermedad es el número de casos que presentan la enfermedad, dividido por el número de individuos que componen el grupo o la población en un determinado momento.

Es un parámetro útil que mide la frecuencia de la enfermedad, y es de gran ayuda para calcular la probabilidad de alcanzar ciertos diagnósticos. La utilizan normalmente los epidemiólogos, las personas encargadas de la política sanitaria, las agencias de seguros y en diferentes ámbitos de la salud pública.

2.2.2. Caracterización genotípica

La ingeniería genética y la biología molecular permiten conocer y estudiar el genoma de las bacterias para su clasificación, de acuerdo a un criterio más amplio que los métodos de caracterización fenotípica. En los últimos años se han introducido métodos moleculares de análisis, cuyo poder de resolución han aumentado la posibilidad de diferenciar entre las cepas bacterianas y ha permitido llevar a cabo estudios epidemiológicos más precisos. La comparación de cepas para definir su identidad se basa en que las cepas relacionadas epidemiológicamente provienen de la expansión clonal de un precursor único. Se entiende por clon, una cepa que ha sido aislada independientemente de la fuente, en diferentes localizaciones o quizás en diferentes tiempos, pero que muestra caracteres fenotípicos y genotípicos significativamente parecidos, de manera que la explicación más lógica para esta similitud es el origen común (Hernández, 2004).

Los métodos de caracterización genotípica disponen en general de mayor poder de discriminación, reproducibilidad y tipabilidad que los métodos fenotípicos, aunque estos últimos sean de gran interés por su mayor sencillez, rapidez, y en general, menor costo. Para la caracterización genotípica de *Salmonella* destacan el perfil plasmídico, los patrones de digestión de ADN por endonucleasas; como los patrones de restricción cromosómica y la electroforesis en campo pulsado (PFGE), el revelado de fragmentos específicos mediante hibridación con sondas (ribotipado y el análisis de ADN cromosomal como el RFLP IS200) y los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (Allen, 2002).

2.2.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Es un método *in vitro* para amplificar secuencias de ácidos nucleicos seleccionados (ADN o ARN). Consiste en ciclos repetitivos de desnaturalización de ADN, unión de los “primer” o cebadores y extensión o polimerización del ADN mediante una enzima polimerasa. Dos oligonucleótidos (“primer” o cebadores) delimitan el segmento de ADN que se va a amplificar. Ellos hibridizan cadenas opuestas y la síntesis ocurre cruzada en la región entre los cebadores, yendo siempre de la región 5' a la 3' en las cadenas de moldes, mientras que en el sentido de las regiones 3' a la 5' de los cebadores, se irá formando la nueva cadena, complementaria al brazo de la cadena molde. Permite amplificar una sola cadena de ADN, hasta un aproximado de un millón de copias de la original (Davis, 1986; Lewin, 1994).

2.3. Revisión de literatura

2.3.1. Identificación del género *Salmonella*

2.3.1.1. Características generales

Se denomina salmonelosis a la enfermedad causada por algún miembro del Género *Salmonella*. En el caso de *Cavia porcellus*, se denomina salmonelosis en cuyes a la enfermedad causada por *Salmonella enterica subespecie enterica serovar Typhimurium*.

El Género *Salmonella* según la última edición del Manual de Bergey, forma parte del Phylum Proteobacterias, encuadrada en el Orden Enterobacteriales y pertenece a la Familia Enterobacteriaceae (Bergey, 2001). La *Salmonella* cultivada en placas de agar-sangre durante 24 horas a 37°C, presenta colonias que miden entre 2 y 3 milímetros de diámetro, de color blanco-gris y textura viscosa. Al examen microscópico la *Salmonella* es un bacilo sin cápsula que mide de 2-4 micras de largo por 0,6 micras de ancho. Típicamente son bacilos de corta longitud definidos como Gram negativos no esporulados. Son bacterias de respiración anaerobia facultativa que se caracterizan por ser oxidasa negativas. Mayoritariamente son bacterias móviles por la presencia de abundantes flagelos peritricos. Los miembros del género *Salmonella*, se caracterizan porque no forman acetilmetilcarbinol, producen ácido y gas a partir de la fermentación de glucosa, de manitol y casi siempre de sorbitol. Además, son ureasa y fenilalanina desaminasa negativa, positivos para lisina y ornitina descarboxilasa. Son indol negativo y citrato positivo, y no fermentan la sacarosa, ni el adonitol. En el medio de cultivo TSI (Triple Sugar Iron), la *salmonella* produce normalmente ácido sulfhídrico (H₂S) y no crece en medios con cianida potásica, salvo pocas excepciones (*Salmonella Gallinarum*,

Salmonella Pullorum). La mayoría de las cepas de *Salmonella* muestran variación difásica de los antígenos flagelares. La temperatura óptima de crecimiento para *Salmonella* es de 35 a 37° C, aunque crece dentro de un intervalo de 7° a 54° C., el pH óptimo se sitúa entre 7- 7,5 pudiendo crecer entre 4,1 y 9 (Madigan, 1996).

2.3.1.2. Clasificación de Salmonella

Son bacterias intestinales de los animales de sangre caliente o fría y pocas veces del hombre, todas las especies del género *Salmonella* deben considerarse parásitas, aunque la virulencia oscila extraordinariamente de una especie a otra y entre las cepas. Se eliminan por heces y pueden sobrevivir un tiempo variable en el medio ambiente, según las condiciones de temperatura (crece entre 8 y 45°C y no sobrevive a temperaturas mayores de 70°C.), pH y humedad (Jawetz, 1985; Koneman, 1985; Roof, 1992; Schwartz 1996; Milleman, 1998).

La nomenclatura de *Salmonella* es compleja y ha variado continuamente, desde el concepto inicial serotipo-especie propuesto por Kaufmann en 1966, basado en la identificación serológica de los antígenos somáticos (O) y flagelares (H). Otras propuestas taxonómicas basadas en características clínicas o bioquímicas y más recientemente en el establecimiento de relaciones genómicas. Crosa et al (1973), demostraron mediante estudios de hibridización ADN-ADN, que todos los serotipos de *Salmonella* se relacionaban estrechamente y se debían considerar como una única especie. Reeves (1989), con nuevos análisis de hibridización ADN-ADN describieron una segunda especie, denominada *Salmonella bongori*.

Frecuentemente se utiliza la nomenclatura recomendada por el Centro de Referencia e Investigación de Salmonella de la Organización Mundial de la Salud en el Instituto Pasteur (WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella) que está de acuerdo con los últimos hallazgos genéticos y describe dos especies diferentes: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*. Considerando las características bioquímicas y genéticas, la *Salmonella enterica* se divide en 6 subespecies: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (III a), *diarizonae* (III b), *houtenae* (IV), *indica* (VI). Cada subespecie contiene a su vez varias serovariedades (serotipos) definidas por su fórmula antigénica.

Habitualmente en las comunicaciones científicas las serovariedades se tratan como especies, por ejemplo *Salmonella Typhimurium*. Sin embargo, se recomienda que en los informes, se incluya la serovariedad sin mencionar la especie y/o la subespecie así: *Salmonella serovariedad Typhimurium* (la serovariedad sin cursiva e iniciando con mayúscula), o simplemente *Salmonella Typhimurium*, lo cual evita nombres demasiado largos como *Salmonella enterica*, subespecie enterica serovariedad Typhimurium (Miller et al. 1997; Prado et al, 1994).

2.3.1.3. Principios de tipificación bacteriana.

Un método de tipificación es aquel que puede ser usado para diferenciar cepas bacterianas pertenecientes a una misma especie. La esencia del uso de estos métodos, es la de ser capaz de comparar aislamientos y agrupar cepas con idénticos resultados en un mismo grupo. Cuando dos aislamientos estudiados rinden resultados diferentes, según uno o más métodos de tipificación, en

general puede concluirse que derivan de diferentes líneas clonales. Sin embargo, para poder ubicar distintos aislamientos en una misma línea clonal, se requieren resultados coincidentes en más de un método de tipificación.

Los métodos de tipificación deben cumplir tres requisitos esenciales: 1) poder de tipificación (ser capaces de catalogar cualquier aislamiento en un tipo determinado); 2) Poder discriminatorio (ser capaces de discriminar entre aislamientos no relacionados); 3) reproducibilidad (ser capaces de brindar resultados reproducibles entre diferentes ensayos y estables para una cepa dada obtenida de diferentes orígenes). A la hora de evaluar un método de tipificación, además de considerar estos requisitos, se considera también la sencillez de realización y de interpretación de resultados.

Los métodos de tipificación caen en dos amplias categorías: fenotípicos y genotípicos. Los primeros son aquellos que caracterizan los productos de la expresión génica para diferenciar cepas, estudiando propiedades bioquímicas, antigénicas, sensibilidad a fagos, a antimicrobianos, etc. Estas propiedades, tienen tendencia a variar con las condiciones de cultivo, fase de crecimiento, ocurrencia de mutaciones espontáneas, etc., debido a que son el resultado de la expresión génica. Por otra parte, los métodos genotípicos se basan en el análisis de la estructura genética de un organismo e incluyen polimorfismos en los patrones de restricción del DNA por endonucleasas, perfiles de amplificación génica y perfiles plasmídicos. Estos métodos están menos sujetos a variación natural, aunque pueden afectarse por inserciones o deleciones de DNA en el cromosoma, ganancia o pérdida de DNA extracromosómico o mutaciones aleatorias que puedan crear o eliminar por ejemplo sitios de restricción.

La *Salmonella* esencialmente posee tres capas; membrana citoplasmática (membrana interna), espacio periplásmico (peptidoglicano mureina) y la membrana externa. La membrana citoplasmática está compuesta de fosfolípidos y proteínas, es el sitio donde se lleva a cabo la fosforilación oxidativa y la síntesis de fosfolípidos, peptidoglicanos y lipopolisacáridos (LPS). El espacio periplásmico (peptidoglicano) es una capa delgada que está compuesta por residuos alternantes de ácido N-acetil murámico y N-acetilglucosamina. La membrana externa esta compuesta por una bicapa de lípidos que rodea la capa de peptidoglicano y protege el periplasma del medio ambiente externo, también previene la pérdida de proteínas periplásmicas proveniente de la membrana citoplasmática (Prescott, 2001).

La salmonelosis en cuyes presenta un cuadro de síntomas que pueden ser agrupados bajo dos formas: Aguda y crónica.

La salmonelosis forma aguda en la mayor parte de los casos, manifiesta signos que duran máximo 8 horas y luego se produce la muerte. Los síntomas más comunes son decaimiento, postración, erizamiento de pelos, anorexia y parálisis de los miembros posteriores. A veces diarrea acompañada de mucus y, en hembras gestantes, se producen abortos. La forma crónica muestra un adelgazamiento paulatino, pelaje deslucido, aumento del volumen del vientre debido a ascitis. Es posible la presentación de casos de queratoconjuntivitis y abscesos subcutáneos en la papada o en los costillares. En la necropsia se observa el hígado agrandado con presencia de zonas necróticas y focos purulentos. El bazo se presenta con un tamaño mayor que el normal y focos purulentos. El tracto intestinal se presenta congestionado y hemorrágico con ulceraciones y presencia de focos purulentos a manera de pequeñas perlas. La

afección de la mayoría de los órganos evidencia su carácter septicémico. Los linfonódulos mesentéricos se presentan aumentados de tamaño, congestionados y, en algunas ocasiones, presentan abscesos que sobresalen de la superficie del órgano. La congestión del tracto intestinal sólo se manifiesta en cuyes adultos y se asocia a la hipertrofia de las Placas de Peyer. Tanto los riñones como el tracto uterino pueden estar congestionados y con infiltración de células inflamatorias (FAO, 1997).

2.3.1.4. Epidemiología

La fuente más importante de contaminación, son las heces de animales con un cuadro subclínico o portadores sanos. Otras fuentes de contaminación son las heces de humanos, animales y aves de corral, abonos y alimentos para animales preparados con harina de hueso, harina de pescado y de carne (Carter y Chengappa, 1994; Blaha 1995; Nielsen, 1995; Baggesen, 1996; Davies, 1997; Turney 1997).

Tienen importancia epidemiológica como fuente de contagio, los animales de vida silvestre, de zoológico y las mascotas. Las aves migratorias pueden difundir las salmonellas por naciones y continentes. En particular, los roedores y posiblemente también los insectos, desempeñen un papel nada despreciable en la epidemiología de las infecciones por Salmonella. La contaminación de alimentos por microorganismos, es un problema de todos los tiempos y con el mejoramiento de las condiciones sanitarias, el problema se ha logrado disminuir considerablemente. Sin embargo, difícilmente desaparece aún en países desarrollados. Los productos cárnicos son seguros cuando se manejan en forma adecuada, pero, cuando existe una pobre higiene o un mal cocimiento puede ocasionarse cuadros de salmonelosis (Bello et al, 1990).

La producción animal es parte de la cadena alimenticia; por lo tanto, los productores toman en cuenta las expectativas de consumo, las demandas en el campo de la salud animal y el medio ambiente (Noordhuizen y Frankena, 1999). Algunos estudios indican que el uso de antibióticos y vacunas no ayuda a reducir la prevalencia de la infección. La estrategia es enfatizar en las medidas de bioseguridad relacionadas con las prácticas de manejo e higiene (Mousing, 1997). Muchos animales, pueden estar infectados en forma natural con *Salmonella* y contener a los microorganismos en sus tejidos corporales, sus excreciones o sus productos. El problema se agrava aún más por el uso indiscriminado de antimicrobianos como promotores de crecimiento y en la prevención de enfermedades, los cuales favorecen la proliferación de salmonellas resistentes a los medicamentos y como consecuencia aumentan su potencial de transmisión al hombre y convertirse en un problema de salud pública (Jawetz, 1985).

2.3.1.5. Patogénesis

El lipopolisacárido (LPS) de la membrana celular de *Salmonella* es el principal determinante de virulencia en los huéspedes específicos. El LPS intacto en la membrana de la salmonella, le proporciona resistencia a la fagocitosis, al ataque por macrófagos y por el complemento. Adicionalmente, se ha demostrado que el LPS contribuye a la sobrevivencia de *Salmonella* en el tracto intestinal. (Jubb, 1993; Schwartz, 1996; Prescott, 2001).

El primer paso importante en la patogénesis de la *Salmonella* es la 1 que se convierten en portadores sanos o colonizados por las heces, lo que permite una especie de reinfección asociación y unión con el epitelio intestinal, especialmente en el íleon que ocurre gracias a la

presencia de flagelos y adhesinas. Las fimbrias tipo 1 (manosa sensibles y las manosa resistentes), están involucradas en la adherencia e invasión, pero su papel aún no es muy claro. Los flagelos permiten la asociación con el epitelio intestinal, pero también es un importante factor que permite la supervivencia dentro de los macrófagos. Las investigaciones hechas en *Salmonella* Typhimurium aislada de animales, demostraron que el 98% de éstas poseen fimbria tipo I y todas tienen flagelo. La invasión es un requerimiento indispensable para la patogénesis, la habilidad de la bacteria para invadir es codificada por plásmidos específicos. Estos plásmidos de virulencia tienen un rango de tamaño de 100 kilobases (kb) en *Salmonella* Typhimurium. La extracción de este plásmido y la administración oral da lugar a una *Salmonella* incapaz de invadir a través de las Placas de Peyer a los nódulos linfáticos mesentéricos y esplénicos (Gensberg, 1995).

Van Asten (2005), postula que los enterocitos absorbentes, son en general tan relevantes, como las células M durante la invasión de las *salmonellas spp.*, porque en el intestino el número de enterocitos absorbentes excede ampliamente al número de células M.

La *Salmonella* Typhimurium tiene una citotoxina asociada con la membrana externa (lípidos A), la cual inhibe la síntesis de proteínas y puede explicar los efectos citopáticos asociados con la gastroenteritis. El lípidos A, está asociado con los lipopolisacáridos (LPS) y es la porción tóxica de la molécula. También ha sido demostrada la actividad en macrófagos, que estimulan la pirogenicidad, induce leucocitosis y causa liberación de mediadores químicos que causan shock, resultado de severos cambios vasculares. La habilidad para sobrevivir en el medio ambiente intracelular de la célula del hospedero, puede ser el

problema más significativo asociado con el diagnóstico, vacunación y desarrollo del estado de portador en el cerdo (Roof, 1992; Jubb, 1993).

2.3.1.6. Lesiones anatomopatológicas

Microscópicamente, la mucosa del intestino delgado se encuentra congestionada y con infiltración neutrofílica local o difusa ocasionada por neutrófilos en la lámina propia y folículos linfoides, necrosis de criptas y enterocitos. Las vellosidades del íleon pueden estar acortadas y cubiertas por bacterias, moco y neutrófilos. Sólo en etapas muy tempranas de la enfermedad se observan en la lámina propia y submucosa, macrófagos, linfocitos y neutrófilos (Jubb, 1993; Prescott, 2001).

En fases avanzadas, se hallan bronconeumonías catarrales supurativas, exudados serosos y fibrinosos en las cavidades toráco - abdominal, artritis, tendinitis, vaginitis, onfalitis y con carácter nada raro, también meningitis. Pueden considerarse muy típicos los granulomas exudativos, tendientes a las necrosis presentes en el hígado (nódulos linfoides). Después del aborto, el cuadro anatomopatológico se caracteriza por cotiledones necróticos y engrosados, placenta edematizada con lesiones necróticas y endometritis entre serosa y purulenta. Si los animales superan la enfermedad infecciosa, pueden persistir bacterias en su organismo, preferentemente en el complejo hígado-vesícula biliar, en los ganglios linfáticos mesentéricos y en las amígdalas. Así se originan los portadores sanos, de tanta importancia epidemiológica porque vierten *Salmonella* spp. en el medio ambiente; por lo general de manera intermitente a lo largo de un prolongado periodo de tiempo (meses y a veces años), convirtiéndose así en punto de partida de nuevas infecciones. Cuando se trata de identificar los gérmenes en animales con infección latente

(eliminadores clínicamente sanos), se toman muestras en especial del hígado, ganglios linfáticos hepáticos y vesícula biliar; así como, de los ganglios linfáticos del intestino delgado y amígdalas para el análisis bacteriológico (Blaha, 1995).

2.3.1.7. Resistencia a antibióticos

En veterinaria la resistencia antimicrobiana causa fallas en la terapia (debido a microorganismos resistentes) e incrementa el desarrollo de resistencia en bacterias patógenas zoonóticas. En la producción animal, los antimicrobianos son usados para tres propósitos: terapia, profilaxis y promotores de crecimiento (Baggesen, 1996). El mayor problema es que el grupo de genes de resistencia se ha incrementado y estos residen en los plásmidos u otro elemento genético móvil donde se puede difundir. En numerosas investigaciones realizadas durante las últimas décadas, se ha descrito aislamientos con resistencia múltiple, de las mismas serovariedades, fagotipos y marcadores moleculares (Prescott, 2001).

En estados Unidos de América (USA), se observó resistencia antimicrobiana en 365 aislamientos de *Salmonella* recuperados de nódulos linfoides y contenido cecal en cerdos. La mayor frecuencia de resistencia múltiple incluía tres antibióticos: penicilina G, estreptomicina y clortetraciclina (Farrington, 2001). Sin embargo, la resistencia a las quinolonas en *Salmonella* de origen veterinario fue reportada por primera vez en 1988, en cepas multirresistentes de *Salmonella* Typhimurium DT 204c y muy resistente a las fluoroquinolonas. En 1990 el número de aislamientos de *Salmonella* Typhimurium DT 204c disminuyó en Alemania. Sin embargo, en forma paralela, el número de aislamientos pentarresistentes DT 104 se incremento quedando como el

serotipo y fagotipo más prevalente en aislamientos veterinarios. En Inglaterra y Gales una disminución en la susceptibilidad a fluoroquinolonas en *Salmonella* DT104 fue observada posterior al permiso del uso de enrofloxacin en Veterinaria en 1993.

La distribución general de *Salmonella spp.*, en humanos, animales productores de alimento y otros tipos de animales, es atribuida a *Salmonella* Typhimurium fagotipo DT104. Este fagotipo es muy importante por varias razones. Es multirresistente, tiene una amplia distribución geográfica y puede ser aislada de humanos, alimentos y una gran variedad de especies animales y los genes de resistencia están localizados en el cromosoma (Solórzano, 1998; Threlfall, 1998; Alban, 2002).

Estudios moleculares han demostrado que la resistencia a beta-lactamasas, aminoglicósidos y sulfonamidas, son codificadas cromosómicamente por dos integrones diferentes.

En el Perú prácticamente el uso de antibióticos se hace de una manera irrestricta y esto puede contribuir a la aparición de cepas resistentes o multirresistentes a los antibióticos. En medicina veterinaria se debe conocer el patrón y comportamiento normal de la susceptibilidad antimicrobiana de *Salmonella*, sin embargo pocos son los estudios de este comportamiento y aún menos los estudios que indiquen cual es el origen de esta resistencia o multirresistencia. En este punto los genes plasmídicos y genómicos juegan un papel muy importante para la adquisición de resistencia a los antibióticos, incluyendo las quinolonas, ya que pueden adquirirse o mutar para perjuicio de la salud animal y humana.

En la actualidad la DT104 ha sido reportada en una gran variedad de huéspedes, caballos, cabras, perros, alce, ratón, coyotes, ardillas, pichones y el medio ambiente. En cuyes aún no ha sido reportada la *Salmonella* Typhimurium DT104.

El empleo de antibióticos en la producción animal se justifica desde el punto de vista económico, no solo para el tratamiento de infecciones, sino también como promotor de crecimiento y la prevención de enfermedades. El uso de niveles bajos de antibióticos en los piensos para animales presenta un problema especial: este procedimiento tiene un valor económico real en el incremento de la producción de carne, pero se ha demostrado que aumenta la frecuencia de plásmidos resistentes en la flora intestinal, no solamente de los animales, sino que también puede crear un problema de salud pública (Davis, 1990; Davies y Wray, 1997).

Las técnicas de tipificación molecular son herramientas importantes para los estudios de la infección en humanos, animales y plantas e identificar cepas epidémicas y no epidémicas. Cada método de tipificación puede identificar atributos únicos de cepas bacterianas los cuales se diferencian de otras cepas. La utilidad del método de tipificación en particular puede ser juzgada por la estimación del poder de discriminación, rango de aplicación, reproducibilidad y facilidad de realización (Vatopoulos, 1994; Mazurek, 1996).

Las fluoroquinolonas son potentes agentes antimicrobianos, derivados del ácido nalidíxico que inhiben la ADN girasa. La ADN girasa activa es un tetrámero compuesto por dos subunidades A y dos subunidades B con una masa molecular de 97 y 90 kilodaltones (Kda) cada monómero respectivamente, son codificadas por los genes GyrA y GyrB. Estas enzimas

mantienen el DNA bacteriano en un estado supercoloidal negativo por la utilización de magnesio y Adenosin-tri-fosfato (ATP), juega un papel crucial en cada uno de los tres estados mayores involucrados en la replicación de cromosomas bacterianos: iniciación, propagación y terminación (Neihardt, 1987; Reyna, 1995).

La actividad de la DNA girasa puede ser selectivamente inhibida por las quinolonas. Aparentemente las quinolonas se unen al complejo DNA girasa e interactúan con la hilera simple del DNA. Para que esto sea realizado, los iones magnesio son necesarios para la unión quinolona-DNA y posiblemente para la formación del complejo DNA-quinolona-girasa. Un punto simple de mutación en el gen GyrA que le confiere la resistencia a las quinolonas ha sido descrito para una variedad de microorganismos. Estas mutaciones ocurren en una región conservada del área N-terminal de la subunidad A hasta el sitio catalítico Tyr-122, denominado “quinolone resistance determining region (QRDR; por sus siglas en inglés). Se han descrito aislamientos clínicos de *Salmonella* Typhimurium resistente a ciprofloxacina y fue asociado con alteraciones en ambas subunidades de girasa; la localización exacta y los cambios genéticos asociados con estas mutaciones no han sido definidos claramente (Reyna, 1995).

La probable explicación para la diferencia de la eficacia *in vitro* e *in vivo*, es la inadecuada concentración intracelular (macrófagos) de los agentes antimicrobianos. Las fluoroquinolonas han demostrado su actividad *in vitro* contra cepas de *Salmonella* y su habilidad para penetrar las células, demostrando que son agentes efectivos contra estos patógenos. Ciprofloxacina se ha utilizado satisfactoriamente en el tratamiento de portadores crónicos de

Salmonella, en infecciones agudas la droga acorta la duración de los síntomas y la excreción fecal de la bacteria. Sin embargo, se ha reportado el desarrollo de resistencia durante la terapia de enterocolitis causada por diferentes serotipos de *Salmonella*. En aislamientos clínicos de *Salmonella* Typhimurium con altos niveles de resistencia a fluoroquinolonas (CMI de ciprofloxacina de 32 mg/L), fue demostrada la alteración de los genes GyrA y GyrB (Reyna et al., 1995).

El diagnóstico de *Salmonella* en el laboratorio se lleva a cabo mediante cultivo, aislamiento e identificación bioquímica. El uso de antisueros es importante para su confirmación serológica. La serotipificación de *Salmonella* tiene gran importancia desde el punto de vista epidemiológico, ya que permite en estudios de brotes determinar la prevalencia de una serovariedad en distintas zonas geográficas (Zaidi, 2001).

2.3.1.8. Epidemiología molecular

La epidemiología molecular es una nueva rama de la ciencia fruto de la integración de la biología molecular con la investigación epidemiológica tradicional. Se define como una ciencia enfocada al estudio a nivel molecular, de la etiología, distribución y prevención de enfermedades genéticas, infecciosas y ambientales en las poblaciones humanas, de animales y de plantas y sus posibles interacciones. Esta ciencia nos permite identificar y confirmar brotes, identificar la fuente de contaminación y las rutas de diseminación, evaluar si un aislamiento es parte del brote o si se relaciona con casos esporádicos, confirmar la asociación con un vehículo o vector, determinar si una infección es nueva o recurrente, realizar análisis de clonalidad; es decir, establecer relaciones genéticas entre dos o más

microorganismos, comparando perfiles de DNA “fingerprinting” de varios aislamientos a la vez. Es importante establecer relaciones epidemiológicas entre los distintos aislamientos considerando las relaciones de tiempo y espacio. (Goering, 1993; Woodford, 1998).

Actualmente se sabe que *Salmonella* cuenta con cinco islas de patogenicidad. En la isla de patogenicidad 1 (SPI-1) del centisoma 63, se encuentran los genes involucrados en la invasión, apoptosis de macrófagos y activación de cascadas de fosforilación dependientes de MAP cinasas. Los genes localizados en las islas SPI-2 y SPI-3 regulan la supervivencia y replicación bacteriana en los compartimientos intracelulares de fagocitos y células epiteliales. La isla SPI-4 codifica un supuesto sistema de secreción tipo I y se cree que participa en la adaptación en ambientes intracelulares. Finalmente, la isla SPI-5 codifica para factores involucrados en la secreción fluida y reacción inflamatoria en la mucosa intestinal. Debido a una regulación coordinada y precisa de los genes de virulencia, la *Salmonella* logra adaptarse a cambios ambientales que se le presentan durante el proceso infeccioso (Figueroa, 2005).

2.3.1.9. Salmonelosis como zoonosis:

En los últimos 20 años, en humanos ha aumentado significativamente, la incidencia de infecciones producidas por *Salmonella* Typhimurium multirresistente a drogas, especialmente el genotipo DT 104. Significa un aumento de problemas de salud pública en todo el mundo (Morten, 2005). El mayor peligro para la salud humana es la contaminación de los alimentos con salmonella y si en los próximos años se incrementa la exportación de cuyes, se requiere estar en capacidad de acreditar que los centros de producción son libres de salmonelosis y por lo tanto, la carne de cuy será inocua. La inocuidad

debe ir acompañada de la excelente composición química de la carne (proteínas).

2.3.2. Antecedentes de investigación:

El cuy (*Cavia porcellus*), es una especie originaria de la zona Andina del Perú, Ecuador, Colombia y Bolivia, es un producto alimenticio nativo, de alto valor nutritivo y bajo costo de producción, que contribuye a la seguridad alimentaria de la población rural de escasos recursos, se cría fundamentalmente con el objeto de aprovechar su carne. También es conocido con los nombres de cobayo, curi, conejillo de indias y en países de habla inglesa como Guinea pig. La población de cuyes en los países andinos se estima en 36 millones de animales. En el Perú y Ecuador la cría está difundida en la mayor parte del país; en Bolivia y Colombia está circunscrita a determinados departamentos, lo cual explica la menor población animal en estos países. Se estima un consumo anual aproximado de 65 millones de cuyes, que representan 39 000 toneladas métricas de carne y significa un ingreso anual de 195 millones de Nuevos Soles. Además, se calcula en el 2003 una población (Ministerio de Agricultura (INIA y DGPA) de 23 240 846 cabezas y en la sierra se encuentra el 92.35% (21 462 950 animales).

Uno de los primeros eventos en la patogénesis de *Salmonella* Typhimurium es la interacción entre la bacteria y el mucus del intestino. Así después de la exposición de *Salmonella* Typhimurium, se demostró que la presencia de la bacteria sobre o dentro de la mucosa del colon de cuyes y la agregación de *Salmonella* Typhimurium podría ser inhibida por azúcares: La L-fructosa causa la inhibición más alta, seguida por D-glucosa, D-galactosa y D-manosa. Oralmente se administró *Salmonella* Typhimurium, para demostrar que eran

afectadas las Placas de Peyer en toda la extensión del intestino. Olfert (1995) aisló un nuevo serotipo de *Salmonella* en cuyes denominada *ochiogu*, se caracteriza por causar infección sistémica e intestinal afectando a cuyes de todas las edades. Se desarrolló un monitoreo consistente en muestreo fecal y la enfermedad fue erradicada usando las siguientes medidas: 1) eliminación de animales que tuvieron contacto con los animales afectados, y 2) procedimientos higiénicos estrictos.

Desde la supresión química de la respuesta inmune humoral en pollos y cuyes inmunizados exhiben distinta inhibición de la migración de macrófagos. Se concluye que la inmunidad celular es un prominente factor en la protección (Cameron, 1976).

Diferentes grupos de ratones fueron inmunizados con dosis óptimas de vacunas de *Salmonella* Typhimurium W118-2: acetone-killed cells, lipopolisacáridos, ribosomas, y células vivas. A las 3 semanas, al mes, 2 meses, 4 meses o 6 meses post inmunización, se colectaron sueros del grupo vacunados y no vacunados para determinar los títulos de aglutinación de anticuerpos que permanecen hasta por 6 meses. La vacuna de ribosomas respondió mejor en comparación con la vacuna de lipopolisacáridos. Igual respuesta se obtuvo con bacterias muertas con acetona y ambas proveen larga inmunidad (Angerman, 1980).

En dos brotes naturales de infección con *Salmonella* Typhimurium en cuyes, se presentaron altas incidencia de conjuntivitis y abscesos nódulo linfoides cervicales de donde con frecuencia se aislaron bacterias. Sugiriendo que la ruta conjuntival es más importante que la ruta oral en la infección por *Salmonella* Typhimurium. La inmunidad producida por una variante de

Salmonella Dublín contra *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* choleraesuis, fue evaluada en cuyes. De 334 cuyes madres adultas, 53 (15.9%) murieron en un brote de *Salmonella* Typhimurium serotipos 1, 4, 5, y 12; i: 1, 2. El útero estuvo seriamente afectado. Otras 9 madres libres de *Salmonella* fueron inoculadas con un aislado puro vía subcutánea, intramuscular o por vía oral, todas murieron reproduciendo los síntomas y lesiones similares al brote. Los aislados fueron sensibles a gentamicina, tetraciclina, ampicilina y cefuroxina, pero resistentes a cotrimoxizole, eritromicina y penicilina (Okewole, 1989).

Belfort (1985) describe cuadros de queratitis y conjuntivitis, inducida experimentalmente en cuyes por *Salmonella* spp. La conjuntiva de los cuyes fueron instilados con *Salmonella* Typhimurium y los ojos fueron estudiados por biomicroscopía, cultivos, citología, patología y microscopía electrónica. Todos los cuyes desarrollaron conjuntivitis de moderada a severa. La conjuntivitis fue más intensa a los 10 días y desaparece antes del día 30. Todos los cultivos todos fueron positivos entre el día 1 y 2, disminuyendo a un 10% al día 10. Posteriormente fueron negativos.

2.3.3. OBJETIVOS

La escasa información científica existente sobre la caracterización fenotípica y molecular de la *Salmonella* spp., causante de Salmonelosis en cuyes, impide el desarrollo y aplicación de programas de control epidemiológico a nivel de unidades productivas.

2.3.3.1. Caracterizar fenotípicamente a la *Salmonella* spp causante de salmonelosis en cuyes.

2.3.3.2. Caracterizar genotípicamente a la *Salmonella* spp causante de salmonelosis en cuyes.

2.3.4. HIPÓTESIS

Dado que existe información bibliográfica sobre los principios inmunológicos que rigen el desarrollo de antígenos y anticuerpos. Es posible caracterizar feno y genotípicamente a la *Salmonella spp* causante de salmonelosis en cuyes.

2.4. Planteamiento operacional

2.4.1. Fenotipificación: técnicas, instrumentos y medios de verificación.

Las técnicas de laboratorio utilizadas son: de tipo general y específico:

2.4.1.1. Diagnóstico clínico:

Combina varios datos sobre antecedentes, signos, síntomas, para determinar un diagnóstico presuntivo de la salmonelosis.

2.4.1.2. Infección experimental:

Consiste en administrar a cuyes una determinada cantidad de unidades formadoras de colonias de *Salmonella Typhimurium* que fueron aisladas de cuyes enfermos, con el fin de provocar la enfermedad y determinar periodo de incubación, la presencia de signos y síntomas.

2.4.1.3. Necropsia:

La necropsia es un procedimiento de diagnóstico que realizado con habilidad, cuidado, espíritu de observación, sentido común y unido a una inteligente interpretación de los hallazgos post mortem, da un alto grado de eficiencia y apoyo en el diagnóstico.

2.4.1.4. Medios de cultivo:

En el período 2005-2006 se aislaron 287 cepas de *Salmonella spp*. Siguiendo el siguiente procedimiento:

- **Toma de muestras:** Las muestras de hígado, bazo, pulmones, bilis, ganglios mesentéricos e intestino delgado, obtenidas de la necropsia de cuyes, son sembradas y cultivadas en agar Mc Conkey y agar Sangre durante 24 horas a 37°C. Luego se observa si las colonias que desarrollaron en agar Mc Conkey son transparentes, de color amarillo (no fermentadoras de lactosa) y de un diámetro de 1 – 2 milímetros. Luego se procede a una coloración de Gram para confirmar si son Gram negativas. Se concluye que se ha visualizado colonias sospechosas de *Salmonella spp.*

- **Hisopados para coprocultivo:** Con hisopos estériles se toma muestras de la ampolla rectal de los cuyes y fueron transportadas en medio de transporte Stuart hasta el laboratorio, donde siguió el siguiente protocolo:

Enriquecimiento no selectivo: Las muestras son incubadas en agua de peptona por 24 horas a 37°C;

- **Enriquecimiento selectivo:** Se cultiva en caldo selenito por 24 horas a 37°C;

- **Siembra en placa de medio sólido selectivo y diferencial:** Se utilizó el agar verde brillante por 24 horas a 37°C. Si existe crecimiento de colonias de color rojo grosella, son consideradas sospechosas.

- **Agua de peptona:** Peptona 1.0 g y agua para llevar a 1000 cm³

Disolver la peptona en aproximadamente 950 cm³ de agua. Ajustar el pH con solución de hidróxido de sodio 1 mol/L o ácido clorhídrico 1 mol/L de modo que después de la esterilización el pH, sea de 7.0. Aforar a 1000 cm³ con agua destilada, distribuir en volúmenes convenientes y esterilizar en autoclave a 121°C) durante 15 minutos a una presión manométrica de 1.5 Kg/cm².

- **Caldo Selenito:** Se usó para enriquecimiento de miembros del grupo *Salmonella*, cuando se aíslan de materiales infecciosos como heces, orina, etc.

El selenito inhibe a los coliformes, enterococos y estafilococos, no así a las *Salmonella*, *Proteus*, *Shigella* y *Pseudomonas*. Los caldos de enriquecimiento son útiles para la recuperación de *Salmonella* a partir de portadores, en los cuales el número de microorganismos puede ser tan bajo como 200 UFC/g (unidades formadoras de colonias por gramo de heces).

- **Agar verde brillante:** Medio de enriquecimiento sólido altamente selectivo para el aislamiento de *Salmonella spp.*, a partir de muestras clínicas, alimentos y otros materiales de importancia sanitaria. Es de un valor excepcional cuando se investiga un gran número de muestras de heces o alimentos, por su alta capacidad de diferenciación de las colonias sospechosas.

La pluripectona y el extracto de levadura, constituyen la fuente de nitrógeno, vitaminas y minerales. La lactosa y la sacarosa, son hidratos de carbono fermentables. El rojo fenol es el indicador de pH, que vira al amarillo cuando hay producción de ácido a partir de la fermentación de azúcares. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el verde brillante actúa como agente selectivo.

2.4.1.5. Confirmación bioquímica de colonias sospechosas.

Las técnicas de identificación bioquímica utilizadas en el presente trabajo son:

- Agar hierro tres azúcares (TSI), se considera que la colonia es sospechosa cuando la parte inclinada (pico de flauta) es de color rojo; la columna de medio ácida presenta color amarillo; con o sin producción de ácido sulfhídrico.
- Agar urea, se considera colonia sospechosa cuando el agar no sufre cambios de coloración y se dice urea negativa.

2.4.1.6. Serotipificación:

La base de la serotipificación para todas las enterobacterias es similar y consiste en poner en evidencia la presencia de antígenos somáticos, flagelares y capsulares. En el caso de *Salmonella*, las serovariedades surgen como consecuencia de una asociación particular de factores antigénicos somáticos O y flagelares H.

Los antígenos somáticos (O) están compuestos por complejos de fosfolípidos y polisacáridos; su composición es aproximadamente: 60% polisacáridos, 20-30% lípidos y 3,5-4% hexosamina. La estructura somática se denomina con la letra O seguida de números arábigos separados por comas, que corresponden a sus factores, por ej. *S. Typhimurium* O:1,4,5,12; *S. Enteritidis* O:1,9,12.

Antígenos Flagelares (H): En la serotipificación flagelar de *Salmonella* se usa solamente la especificidad antigénica del filamento. El filamento está constituido por flagelina, proteína de alto peso molecular. En *Salmonella* se han encontrado más de 60 especificidades antigénicas flagelares. Las diferencias antigénicas surgen debido a variaciones en la estructura primaria (contenido en aminoácidos y orden de ubicación) de las distintas moléculas de flagelina.

2.4.1.7. Determinación de resistencia antimicrobiana: Prueba de difusión en sensidiscos en Agar

Método generalmente utilizado y aprobado por el Clinical and laboratory Standards Institute (CLSI) antes llamado National Committee of Clinical and Laboratory Standard (NCCLS) para efectuar las pruebas de sensibilidad. Consiste en inocular mediante una torunda de algodón un inóculo estandarizado de microorganismos en la superficie de una placa Petri con medio Mueller Hinton. Discos de papel filtro impregnado en soluciones antimicrobianas se colocan en el agar. Después de incubar por 24 hrs. Se

miden los halos de inhibición y se comparan con tablas entregadas por la CLSI (antes NCCLS); y de esta manera, se determina si los gérmenes son sensibles o resistentes a los diferentes agentes antimicrobianos.

Procedimiento: Se utilizan placas de Agar Mueller Hinton de 4mm de profundidad, que se llevan a temperatura ambiente antes de inocular. Para preparar el inóculo se toman 5 colonias aisladas y se suspenden en 5 ml de Caldo Mueller Hinton, se incuba a 35°C por 2 a 8 hrs., hasta que el desarrollo alcance la turbidez del Standard Mac Farland 0.5. Con una torunda de algodón inocular la placa de agar en toda su superficie por tres veces en distintas direcciones. Dejar secar la placa por 10 a 15 minutos antes de colocar los sensidiscos. Estos deben ser colocados con una separación mínima de 24 mm entre ellos con una pinza estéril o un dispensador automático presionando levemente sobre el agar. Dejar difundir por 15 minutos y después incubar a 35°C por 16 a 18 hrs. Para leer los halos se coloca la placas invertidas sobre un fondo oscuro e iluminado, medir el halo de inhibición de crecimiento producido por los sensidiscos en milímetros. Comparar los halos de inhibición con las tablas de la CLSI (ex NCCLS) y así se determina la sensibilidad o resistencia del microorganismo a cada agente antimicrobiano.

La lectura de los halos en milímetros se hizo mediante un vernier-calipers. Los antibióticos utilizados son: gentamicina (GEN), florfenicol (FLC), ciprofloxacina (CIP), trimetoprima + sulfametoxazol (TMS), tetraciclina (TET), cloranfenicol (CMP), enrofloxacin (EFC), ampicilina (AM), cefquinona (CEF), neomicina (NE), amoxicilina (AMX), oxitetraciclina (OXT), furazolidona (FR), sulfamidados (SUL), estreptomycin (STR) y norfloxacin (NOR).

La cepa se denomina: Sensible (S), Intermedia (I) o Resistente (R) al antibiótico utilizado. El significado de la categorización de sensibilidad para un determinado antibiótico es: Sensible (S), si existe una buena probabilidad de éxito terapéutico en el caso de un tratamiento a la dosis habitual; Resistente (R), si la probabilidad de éxito terapéutico es nula o muy reducida y no debe esperarse ningún efecto terapéutico, sea cual fuese el tipo de tratamiento; e Intermedia (I), cuando el éxito terapéutico es imprevisible. Es posible conseguir efecto terapéutico por aumento de la posología o aumento de la concentración del antibiótico.

2.4.2. Genotipificación: técnicas, instrumentos y medios de verificación.

La biología molecular concierne principalmente al conocimiento de las interacciones de los diferentes sistemas de la célula, lo que incluye muchísimas relaciones, entre ellas las del ADN con el ARN, la síntesis de proteínas, el metabolismo, y el cómo todas esas interacciones son reguladas para conseguir un afinado funcionamiento de la célula.

2.4.2.1. Extracción de ácidos nucleicos

Las 5 cepas clasificadas fenotípicamente como *Salmonella spp.*, son extraídas del banco de bacterias y cultivadas en Agar Mac Conkey y Agar Sangre.

- Diluir 1 µl de proteinasa K en 300 µl de solución de lisis de células y tejidos contenidos en 5 tubos de ensayo.
- Cosechar las colonias individualmente de los 5 cultivos con una Asa de Kohle y colocar la cosecha en tubos de microcentrífuga y adicionarle 300 µl de la solución que contiene la solución de lisis de células y tejidos mas la proteinasa K. Mezclar completamente por pipeteo.

- Incubar las muestras a 65°C en baño termostático durante 15 minutos, y mezclar las muestras cada 5 minutos en un vórtex.
 - Disminuir la temperatura de incubación a 37°C y añadir 1 µl de RNasa A (5 µg/µl) a cada muestra mezclando completamente por pipeteo.
 - Incubar las muestras a 37° C durante 30 minutos.
 - Colocar las muestras en hielo durante 5 minutos.
 - Añadir 150 µl de MPC (acetato de amonio 5 M) a los 300 µl de muestra lisada y mezclar utilizando vórtex por 10 segundos.
 - Centrifugar durante 10 minutos a 10 000 x g. en una microcentrífuga. El sobrenadante fue transferido a un tubo de microcentrífuga estéril y se descartó el pellet.
 - Adicionar 500 µl de isopropanol para recuperar el ADN del sobrenadante. Se mezcló por inversión de 30 a 40 veces.
 - Centrifugar a 4° C por 10 minutos en una microcentrífuga para precipitar el ADN. Remover cuidadosamente el isopropanol por decantación sin perder el ADN (pellet).
 - Enjuagar el pellet 2 veces con etanol 75% y se removió con una micropipeta el etanol residual.
 - Resuspender el ADN en 50 µl de agua ultra pura estéril.
- Almacenar el ADN extraído a -20°C.
- Determinar por espectrofotometría la concentración de ADN: Añadir 5 µl de la suspensión de ADN a 995 µl de agua destilada estéril y medir la absorbancia a 260 nanómetros (nm) en un espectrofotómetro.
 - La pureza del ADN extraído se midió la absorbancia a 260 y 280 nm.

2.4.2.2. Electroforesis de ADN

Preparación de un gel de agarosa al 1.3%:

- Pesar 156 mg de agarosa y disolver en 12 ml de buffer TAE 1X en un vaso de precipitado de 100 ml.
- Calentar en baño termostático hasta la ebullición.
- Enfriar hasta aproximadamente 45°C y añadir 1 μ l de bromuro de etidio (10 mg/ml).
- Vaciar en un vidrio en posición horizontal y colocar una peineta en un extremo del vidrio para formar pocillos y dejar enfriar a temperatura ambiente por 30 minutos. Retirar la peineta
- Colocar el gel dentro de la cámara de electroforesis y cubrirlo con buffer TAE 1X.
- Colocar en cada pocillo 5 μ l de ADN previamente mezclado con 1 μ l de Loading Buffer 6X. Añadir a los pocillos 4 μ l del marcador de peso molecular Φ X174 DNA/HaeIII.
- Conectar la cámara a una fuente de poder y aplicar una potencia de 80 voltios y dejar correr 60 minutos.
- Retirar el gel de la cámara y observar en un cuarto oscuro utilizando un transiluminador 2UV Transilluminator, con lámpara ultravioleta a 302 nm (UVP, California, Estados Unidos).
- Tomar fotos de los geles utilizando una cámara digital Casio modelo Exilim EXZ55.

2.4.2.3. Diseño de primers

Los primers fueron diseñados a partir de 5 secuencias de ADNr 16S representativas de cepas aisladas. Las secuencias fueron obtenidas del RDP (rdp.cme.msu.edu/, actualizado al día 31 de octubre del año 2006). La

identificación de las secuencias altamente conservadas se realizó en el programa ClustalW versión 1.83 mediante alineamiento múltiple de secuencias. Las secuencias obtenidas fueron evaluadas y seleccionaron 3 sitios que permitieran amplificar el gen que codifica el ARNr 16S en dos segmentos y que teóricamente no estuvieran involucrados en la estructura secundaria del ARNr 16S. A través de una búsqueda en las bases de datos del GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/), RDP y Greengenes (greengenes.lbl.gov/) se determinó que estas secuencias estaban altamente conservadas en dominio Bacteria, pero no en Eucariota o Archaea. A partir de esas secuencias se diseñaron dos juegos de primers. La Tm óptima de los primers fue determinada utilizando el programa Tm Calculations for Oligos, BioMath. Calculators de Promega (www.promega.com/biomath/).

2.4.2.4. Reacción de amplificación (PCR)

Para realizar la PCR se utilizó Platinum PCR Supermix High Fidelity (Invitrogen, California, Estados Unidos).

- Añadir a cada tubo de PCR 3 µl de ADN (Concentración X) de cada muestra. Mas 4 µl de la solución de primers y 40 µl de Platinum PCR Supermix High Fidelity. Tapar los tubos
- Colocar los tubos en un termociclador Techne Cyclogene (Techne Inc., New Jersey, Estados Unidos) y se programó la temperatura a 95°C por 60 segundos para desnaturalizar completamente el ADN molde y activar la enzima.
- Programar 25 ciclos a 90°C por 70 segundos (desnaturalización), 35°C por 70 segundos (hibridación) y 70°C por 70 segundos (extensión).

- Finalmente 1 ciclo a 72°C por 7 minutos. Luego de la amplificación las muestras fueron mantenidas en el termociclador a 4°C (post incubación).

2.4.2.5. Electroforesis de productos de PCR

- Preparar un gel de agarosa al 1.3%, para ello se pesaron 156 mg de agarosa y se disolvieron en 12 ml de buffer TAE 1X (Tris-acetato 2 M, EDTA 0.05 M, pH 8,3) en un vaso de precipitado de 100 ml, se calentó en baño termostático hasta ebullición para lograr disolución completa.
- Se enfrió hasta aproximadamente 45°C y se añadió 1 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml). Se vació en un vidrio en posición horizontal y luego se colocó una peineta para formar los pocillos y se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- Una vez solidificado el gel se retiró la peineta. Posteriormente el gel fue colocado dentro de la cámara de electroforesis y fue cubierto con buffer TAE 1X.
- En cada pocillo se colocaron utilizando una micropipeta, 5 µl de producto de PCR previamente mezclado con 3 µl de Loading Buffer 6X (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; glicerol 50%, azul de bromofenol 0,25%, azul de xilencianol 0,25%). También se cargaron 4 µl del marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs, Boston, Estados Unidos). Se conectó la cámara a una fuente de poder y se aplicó una potencia de 80 V y se dejó correr durante 60 minutos. Terminada la electroforesis el gel fue retirado de la cámara y observado en un cuarto oscuro utilizando un transiluminador 2UV Transilluminator, con lámpara ultravioleta a 302 nm (UVP, California, Estados Unidos). Se tomaron fotos de los geles utilizando una cámara digital Casio modelo Exilim EXZ55.

2.4.2.6. Purificación de productos de PCR

Extracción y purificación de productos de PCR del gel de agarosa

- Para extraer los productos de PCR del gel de agarosa, se cortaron las bandas utilizando un bisturí estéril y se colocaron en tubos de microcentrifuga estériles rotulados.
- Se pesaron los geles y se añadieron 300 µl de Buffer QG (tiocianato de guanidina 50 - 100%, indicador de pH) a 100 mg de gel. Se incubó a 50°C durante 10 minutos, cada 2 minutos se llevó al vórtex para ayudar a disolver el gel.
- Se añadieron 100 µl de isopropanol al tubo de micro centrifuga y se mezcló por pipeteo. Luego se colocó una columna dentro de un tubo colector de 2 ml. Para unir el ADN a la columna, se añadió la muestra a la columna y se centrifugó en una micro centrifuga durante 60 segundos a 10000 rpm.
- Descartar el filtrado y colocar nuevamente la columna dentro del mismo tubo. Para lavar, se añadieron 750 µl de Buffer PE (etanol 75%) a la columna, se esperó 5 minutos y se centrifugó 60 segundos a 10000 rpm. Se eliminó el filtrado y se volvió a colocar la columna dentro del mismo tubo y se centrifugó la columna por 90 segundos. Luego se colocó la columna en un tubo de microcentrifuga estéril. Para eluir el ADN se añadieron 50 µl de Buffer EB (Tris-HCl 10 mM, pH 8.5) al centro de la membrana, se esperaron 10 minutos y se centrifugó la columna durante 60 segundos a 10000 rpm.
- Se mezclaron por pipeteo 250 µl del Buffer PB (guanidina HCl 25 - 50%, isopropanol 25 - 50%, indicador de pH) con 50 µl del producto de PCR en

un tubo de microcentrífuga. Colocar una columna dentro de un tubo colector de 2 ml. Para unir el ADN a la columna, se añadió la muestra a la columna y se centrifugó en una microcentrífuga durante 60 segundos a 10000 rpm.

- Descartar el filtrado y colocar nuevamente la columna dentro del mismo tubo. Para lavar, se añadieron 750 μ l de Buffer PE (etanol 75%) a la columna, se esperó 5 minutos y se centrifugó 60 segundos a 10000 rpm. Se eliminó el filtrado y se volvió a colocar la columna dentro del mismo tubo y se centrifugó la columna por 90 segundos.
- Luego se colocaron las columnas en los tubos correspondientes, usados para extracción de productos de PCR a partir del gel de agarosa.

2.4.2.7. Secuenciación del producto de PCR

- El ADN purificado fue enviado al Departamento de Biología Molecular en el Massachussets General Hospital, Boston, Estados Unidos (MGH DNA Sequencing Core Facility), para su secuenciación
- Se añadieron 10 μ l de primer forward (concentración final 10 μ M) a las muestras purificadas. Los tubos fueron claramente etiquetados y enviados a USA.
- En MGH DNA Sequencing Core Facility las muestras son secuenciadas usando el Taq DyeDeoxy Terminator cycle sequencing Kit de Applied Biosystems que utiliza didesoxinucleótidos fluorescentes (método de terminación de cadena). Después de la secuenciación y limpieza, las muestras de ADN son analizadas por electroforesis capilar en un secuenciador automático (ABI 3730XL DNA Analyzer) que traduce las señales fluorescentes en la secuencia de bases correspondiente.

2.4.2.8. Análisis bioinformático de secuencias

Las secuencias de ADNr 16S de cada cepa, obtenidas por secuenciación, fueron alineadas individualmente y comparadas con las secuencias depositadas en la base de datos GenBank y RDP, utilizando BLAST (blastn) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) y Sequence Match respectivamente. Para blast se seleccionó realizar la comparación con una base de datos no redundante (nr). Con la finalidad de construir un árbol filogenético se bajaron secuencias de especies similares del mismo género y géneros relacionados. Las secuencias obtenidas de las bases de datos se cargaron en el programa BioEdit versión 7.0.0 para luego realizar un alineamiento múltiple de las secuencias mediante ClustalW versión 1.83. A partir del alineamiento se construyó el árbol filogenético utilizando TreeView versión 1.6.6 para cada bacteria.

2.5. Campo de verificación

2.5.1. Ubicación espacial: Bioterio de LABVETSUR, distrito, provincia y departamento de Arequipa.

2.5.2. Ubicación temporal:

2.5.2.1. Perfil bioquímico, antibiorresistencia, prevalencia: Enero-diciembre 2005 a enero- diciembre 2006.

2.5.2.2. Seroprevalencia: Octubre – Diciembre 2007.

2.5.2.3. Genotipificación: Enero – marzo 2008

2.5.3. Unidades de estudio: Formación de bloques de unidades experimentales (cuyes).

2.5.4. Diseño experimental:

Se analizará parcelas de observación o verificación con un número variable de repeticiones, analizándose su comportamiento con un análisis de frecuencias.

2.5.5. Técnicas experimentales de laboratorio

Tabla N° 2.- Relación de técnicas de laboratorio utilizadas en la caracterización feno y genotípica del agente etiológico de *Cavia porcellus* (cuyes) en Arequipa.

| Técnicas | Grupo experimental | Grupo testigo |
|---|--------------------|---------------|
| Cultivos en Agar Sangre y Agar Mac Conkey | 20 | - |
| Pruebas bioquímicas | 20 | - |
| Antibiogramas | 100 | - |
| Método de ELISA | 20 | 20 |
| Prevalencia en coprocultivos | 50 | 50 |
| Genotificación | 5 | - |

2.6. Estrategia de recolección de datos

Los resultados de las pruebas experimentales fueron ordenados en tablas y cuadros para la descripción y el análisis correspondiente.

III. RESULTADOS

Los resultados serán sometidos a análisis de frecuencias

VI. BIBLIOGRAFIA

1. Alban L, Stege H y Dahl J. 2002. The new classification system for slaughter-pig herds in the Danish Salmonella surveillance and control program. **Preventive Veterinary Medicine**, 53, 133-146.
2. Allen KJ, Poppe C. 2002. Phenotypic and genotypic characterization of food animal isolated of *Salmonella* with reduced sensitivity to ciprofloxacin. **Microb Drug Resist.** 8(4): 375-383.
3. Angerman CR and Eisenstein TK. Correlation of the duration and magnitude of protection against Salmonella infection afforded by various vaccines with antibody titers. **Infect Immun.** 1980 February; 27(2): 435-443.
4. Baggesen DL, Wegener HC, Bager F, Stege H y Christensen J. 1996. Herd prevalence of Salmonella enterica infections in Danish slaughter pigs determined by microbiological testing. *Preventive Veterinary Medicine*, 26, 201-213.
5. Belfort JR, Toledo MR, Burnier M, Smith RL, Silva VL and Trabulsi LR. Experimental guinea pig ocular infection by *Salmonella typhimurium*. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Vol 26, 591-594, Copyright © 1985 by Association for Research in Vision and Ophthalmology.
6. Bello PL, Ortiz DD, Pérez ME y Castro DV. 1990. Salmonella en carnes crudas: Un estudio en localidades del Estado de Guerrero. *Salud Pública de México*, 32, 74-79.
7. Bergey D. 2001. *Bergey's Manual of Systematic of Bacteriology*.
8. Blaha T. 1995. *Epidemiología especial veterinaria*. Zaragoza, España. Acribia.

9. Briggs CE, Fratamico PM. 1999. Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella* typhimurium DT104. ***Antimicrob Agents Chemother*** 43:846-849.
10. Cabrera R. 2008. Epidemiología y caracterización molecular de los mecanismos de resistencia a diversos agentes antimicrobianos en aislamientos clínicos de *salmonella* sp. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Barcelona. España.
11. Cameron CM, Botha WF, Smit BH. 1976. Antibody response to and immunity induced by *Corynebacterium pyogenes* vaccine. Onderstepoort **J. Vet. Res.**, 43:97-103.
12. Carter GR y Chengappa MM. 1994. Microbiología y micología veterinaria "Aspectos esenciales".(2a ed.) México, D.F.: El Manual Moderno.
13. Cicogna M. 2000. Guide technique d'élevage N°04 sur. Les Cobayes. décembre 2000. editeur responsable : j. hardouin, b.e.d.i.m., fusagx, 5030 gembloux.
14. Clayton DJ, Windhorst D, Vernikos G, Davidson S, Churcher C, Quail MA, Stevens M, Jones MA, Watson M, Barron A, Layton A, Pickard D, Kingsley RA, Bignell A, Clark L, Harris B, Ormond D, Abdellah Z, Brooks K, Cherevach I, Chillingworth T, Woodward J, Norberczak H, Lord A, Arrowsmith C, Jagels K, Moule S, Mungall K, Sanders M, Whitehead S, Chabalgoity JA, Maskell D, Humphrey T, Roberts M, Barrow PA, Dougan G, Parkhill J. Comparative genome analysis of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and

- host adaptation pathways. **Genome Res.** 2008 Oct;18(10):1624-37.
Epub 2008 Jun 26.
- 15.Crosa JH, Brenner DJ, Ewing WH, Falkow S. Molecular relationships among the *Salmonelleae*. **J Bacteriol.** 1973. 115(1):307-315.
 - 16.Davies J. 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. **Science** 264(5157):375-382.
 - 17.Davies R y Wray C. 1997. Study of multi-resistant *Salmonella* typhimurium infection in pig herds: Preliminary finding. **The Pig Journal**, 40, 80-88.
 - 18.Davis BD, Dulbecco R, Eise HN y Ginisberg HS. 1990. Tratado de Microbiología. (3ª ed.) México D.F.: Salvat.
 - 19.Davis LG, Dibner MD, Battey JF. 1986. Basics methods in molecular biology. Elsevier Science publishing Co, Inc. Amsterdam, The Netherlands.
 - 20.De la Torre M. Caracterización molecular y fenotípica como herramienta de marcaje epidemiológico para cepas de *Salmonella* de origen porcino. Tesis Doctoral. Fac. De Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. Marzo 2006.
 - 21.Dusch H, Altwegg M. 1995. Evaluation of five new plating media for isolation of *Salmonella* species. **J Clin Microbiol** 33(4):802-804.
 - 22.Estupiñan E. 2006.La Salmonelosis en cuyes. Alma Mater 121. Carrera de Ciencias Agroambientales y Veterinarias. Universidad Técnica de Cotopaxi. Ecuador.
 - 23.FAO. 1997. Estudios FAO. Producción y Sanidad animal-138.

24. Farmer JJ, Davis BR, Hickman-Brenner FW, McWhorter A, Huntley-Carter GP, Asbury MA, Riddle C, Wathen-Grady HG, Elias C, Fanning GR (1985) Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. ***J Clin Microbiol*** 21(1):46-76.
25. Farrington LA, Harvey RB, Buckley SA, Droleskey RE, Nisbet DJ y Inskip PD. 2001. Prevalence of antimicrobial resistance in *Salmonellae*.
26. Figueroa IM y Verdugo A. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. **Revista Latinoamericana de Microbiología**. Vol. 47, Número 1-2. Enero-Junio 2005. pp 25-42.
27. Gaillot O, Di Camillo P, Berche P, Courcol R, Savage C. 1999. Comparison of CHROMagar *Salmonella* medium and Hektoen enteric agar for isolation of *Salmonellae* from stool samples. ***J Clin Microbiol*** 37(3): 762-765.
28. Gensberg K, Jin FY y Piddock JVL. 1995. A novel gyrB mutations in a fluoroquinolone-resistant clinical isolate of *Salmonella typhimurium*. **FEMS Microbiology Letters**, 132, 57-60.
29. Guerri Santos, LM., 2004. Estudio de la resistencia a antibióticos beta-lactámicos en aislamientos clínicos de “*Salmonella Typhimurium*”. Tesis Doctoral
30. Hoofar J, Baggesen DL. 1998. Importance of pre-enrichment media for isolation of *Salmonella* spp from swine and poultry. ***FEMS Microbiol lett*** 169:125-130.

31. Jaramillo H, Patiño R, Rodríguez J. Detección molecular por PCR de *Y. Pseudotuberculosis* en materia fecal de cuyes (*cavia porcellus*). CORPOICA Vol. 9 No. 1 2008. Colombia.
32. Jawetz E, Melnick JL y Adelberg EA. 1985. Microbiología Médica. (11^a ed.) México D.F.: El Manual Moderno.
33. Jubb KVF, Kennedy PC y Palmer N. 1993. Pathology of Domestic Animals. (4a ed.) London.: Academic Press.
34. Kauffmann F. 1966. The bacteriology of *Enterobacteriaceae*. Munksgaard, Copenhagen, Denmark.
35. Kim H, Park S, and Kim H. Comparison of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium LT2 and Non-LT2 *Salmonella* Genomic Sequences, and Genotyping of Salmonellae by Using PCR. **Appl Environ Microbiol.** 2006 September; 72(9): 6142–6151.
36. Koneman WE, Allen DS, Dowell RV y Sommers MH. 1985. Diagnóstico Microbiológico. México, D.F.: Médica Panamericana.
37. Livermore DM. Clinical Significance of Beta-Lactamase Induction and Stable Derepression in Gram-Negative Rods. **European Journal of Clinical Microbiology** 6:439-445, Ago 1987.
38. Maddocks S, Olma T and Chen S 2002. Comparison of CHROMagar Salmonella medium and xylose-lysine-desoxycholate and Salmonella-Shigella agars for isolation of *Salmonella* strains from stool samples. **J Clin Microbiol** 40(8): 2999- 3003.
39. Madigan MT, Martinko JM, Parker. 1996. Brock biology of microorganism 8th ed. Prentice-Hall College Division, Upper Saddle River, NJ.

40. Malorny B, Schroeter A, Bunge C, Hoog B, Steinbeck A y Helmuth R. 2001. Evaluation of molecular typing methods for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 isolated in Germany from healthy pigs. **Veterinary Research**, 32, 119-129.
41. Mammina C., Cannova L., Carfi Pavia S., Nastasi A. Presencia endémica de *Salmonella enterica* serotipo Cerro al sur de Italia. **Euro Surveill** 2000; 5(7):84-86.
42. Mazurek GH, Reddy V, Marston BJ, Haas WH y Crawford JT. 1996. DNA fingerprinting by infrequent-restriction-site amplification. **Journal of Clinical Microbiology**, 34, 2386-2390.
43. McClelland M, Sanderson KE, Spieth J, Clifton SW, Latreille P, Courtney L, Porwollik S, Ali J, Dante M, Du F, Hou S, Layman D, Leonard S, Nguyen C, Scott K, Holmes A, Grewal N, Mulvaney E, Ryan E, Sun H, Florea L, Miller W, Stoneking T, Nhan M, Waterston R, Wilson RK. 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. **Nature**. 2001 Oct. 25;413(6858):852-6.
44. Milleman, 1998; Milleman, Y. 1988. Epidemiologic markers of *Salmonella* **Veterinary Research**, 29, 3-19.
45. Miller SI, Hohmann EL, Pegues DA. *Salmonella*. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editores. Enfermedades infecciosas: principios y prácticas. 4ªed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1997.p.22-54-76.

46. Morten H. 2005. Health Impact of Zoonotic Salmonella and Other Foodborne Bacterial Gastrointestinal Infections, with Particular reference to Antimicrobial Drug Resistance in Salmonella Typhimurium. PhD thesis, 2005. Department of Epidemiology Research Statens Serum Institut.
47. Neidhardt CF, Ingraham LJ, Low KB, Magasanik B y Schaechter M. 1987. Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Cellular and molecular biology. American Society for Microbiology. Washington, D.C. United States of America.
48. Nielsen B, Baggesen D, Bager F, Haugegaard J y Lind, P. 1995. The serological response to Salmonella serovars typhimurium and infantis in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations. **Veterinary Microbiology**, 47, 205-218.
49. Noordhuizen JP y Frankena K. 1999. Epidemiology and quality assurance: applications at farm level. **Preventive Veterinary Medicine**, 39, 93-110.
50. Okewole PA, PS Odeyemi, IL Oyetunde, E Irokanulo, and JC Chima. Abortion in guinea pigs Vet Rec. 1989 124: 248.
51. Olfert ED. 1995. Defining an acceptable endpoint in invasive experiments. **AWIC Newsletter** 6 (1):3-7.
52. Olson AB, Andrysiak AK, Tracz DM, Guard-Bouldin J, Demczuk W, Ng LK, Maki A, Jamieson F, Gilmour MW. Limited genetic diversity in

- Salmonella enterica Serovar Enteritidis PT13. **BMC Microbiol.** 2007 Oct 1;7(1):87.
- 53.Otero P. Farmacología y Bases de la Terapéutica Veterinaria: Agentes Antimicrobianos Quimioterápicos. Rubén Hallú 1998; 4:71.
- 54.Piddock LJ, Ricci V. McLaren I. Griggs, D.J. Role of mutation in the gyrA and parC genes of nalidixic-acid-resistant Salmonella serotypes isolated from animals in the United Kingdom. **J Antimicrob Chemother** 1998; 41: 635-641.
- 55.Prado V, O'Ryan M. Acute gastroenteritis in Latin America **Infect Dis Clin of North Am** 1994; 8: 77-106.
- 56.Prescott JF. Veterinary Microbiology, Volume 81, Number 3, 8 August 2001, pp. 281-282(2).
- 57.Ramírez VLA. 1972. *Estudio bacteriológico y epidemiológico de un brote infeccioso en cobayos*. UNMSM, Lima, Perú. (Tesis.)
- 58.Reeves MW, Evins GM, Heiba AA, Plikaytis BD, Farmer JJ III (1989) Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis and proposal of *Salmonella bongori* comb nov. **J Clin Microbiol** 27:313-320.
- 59.Reyna F, Huesca M, González V, Fuchs Y. 1995. Salmonella typhimurium gyrA mutations associated with fluoroquinolone resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 39, 1621-1623.
- 60.Roof BM, Roth J, Kramer TT. 1992. Porcine salmonellosis characterization, Immunity and potential vaccines. Compendium on continuing education for the practicing veterinary. Article #10. 14, USA.

- 61.Schroeder CM, Zhao C, DebRoy C, Torcolini J, Zhao S, White DG, Wagner DD, McDermott PF, Walker RD, Meng J. 2002. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food. **Appl Environ Microbiol** 68(2):576-581.
- 62.Schawarts J.K. 1966. La salmonelosis en el cerdo. PIGS-Misset. 18-21.
- 63.Solórzano SF y Miranda NMG. 1998. Resistencia de bacterias respiratorias y entéricas a antibióticos. Salud Pública de México, 40, 509-515.
- 64.Swaminathan B, Matar GM. Molecular typing methods: definition, applications, and advantages. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, eds. Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications. Washington DC: America Society for Microbiology; 1993:26-50.
- 65.Tenover FC, Robert D, Arbeit MD, Goering RV. How to Select and Interpret Molecular Strain Methods for Epidemiological Studies of Bacterial Infections: A Review for Healthcare Epidemiologists. **Infect Control and Hosp Epidemiology** 1997.p.426-439.
- 66.Threlfall EJ, Angulo FJ y Wall PG. 1998. Ciprofloxacin- resistant *Salmonella typhimurium* DT104. **The Veterinary Record**, 142, 255.
- 67.Threlfall EJ, Torre E, Ward LR, Davalos-Pérez A, Rowe B, Gibert I. 1994. Insertion sequence IS200 fingerprinting of *Salmonella Typhi*: an assessment of epidemiological applicability. **Epidemiol Infect** 112(2):253-261.

68. Thomson NR, Clayton DJ., Windhorst D. et al. Comparative genome analysis of *Salmonella* Enteritidis PT4 and host adaptation pathways *Salmonella* Gallinarum 287/91. **Genome Res.** published online June 26, 2008.
69. Turney, H.I., Fedorka-Cray, P.J., Gray, J.T., Thomas, L.A., y Ferris, K. (1997). Prevalence of *Salmonella* organisms in swine feed. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 210, 1997.
70. Uribe C. y Suárez M. Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. Volumen 37 N° 2, 2006 (Abril-Junio).
71. Van den Bogaard AE., Stobberingh EE (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. **Int J Antimicrob Agents** 14. (4):327- 335.
72. Van Asten A, Koninkx J, Van Dijk J. *Salmonella* Entry: M cells versus absorptive enterocytes. **Veterinary Microbiology** 108 (2005) 149-152.
73. Vatopoulos, A.C., Mainas, E., Balis, E., Threlfall, E.J., Kanelopoulou M., Kalapothaki, V., Malamou-Lada H., y Legakis N.J. 1994. Molecular epidemiology of ampicillin-resistant clinical isolates of *Salmonella* enteritidis. **Journal of Clinical Microbiology**, 32, 1322-1325.
74. WHO Global Salm-Surv South America Working Group. WHO Global Salm-Surv. A WHO Global Salm-Surv Retrospective Study Examining *Salmonella* Serotypes in South America, 2000: Dominance of *Salmonella* Serotype enteritidis. International Conference on emerging Infectious Diseases, Atlanta, 2002.

75. Witte W. 1998. Medical consequences of antibiotic use in agriculture.

Science 279(5353):996-997.

76. Woodford N., Johnson A. Molecular Bacteriology: Protocols and Clinical Applications. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey 1998.

77. Zaidi M, Hermosillo J, Zamora E. 2001. Conservación de cepas. En: Curso Internacional de Entrenamiento sobre Vigilancia de Salmonella y Resistencia Antimicrobiana en Patógenos Transmisibles por Alimentos. Fundación Mexicana para la salud. México. pp. 49-53.

